

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
24. Februar 2005 (24.02.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/017533 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/68,  
B01J 19/00, C30B 7/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/008813

(22) Internationales Anmeldedatum:  
6. August 2004 (06.08.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 36 110.3 6. August 2003 (06.08.2003) DE  
04001722.0 27. Januar 2004 (27.01.2004) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): **PROTEROS BIOSTRUCTURES GMBH**  
[DE/DE]; Am klopferspitz 19, 82152 Martinsried (DE).

(72) Erfinder; und

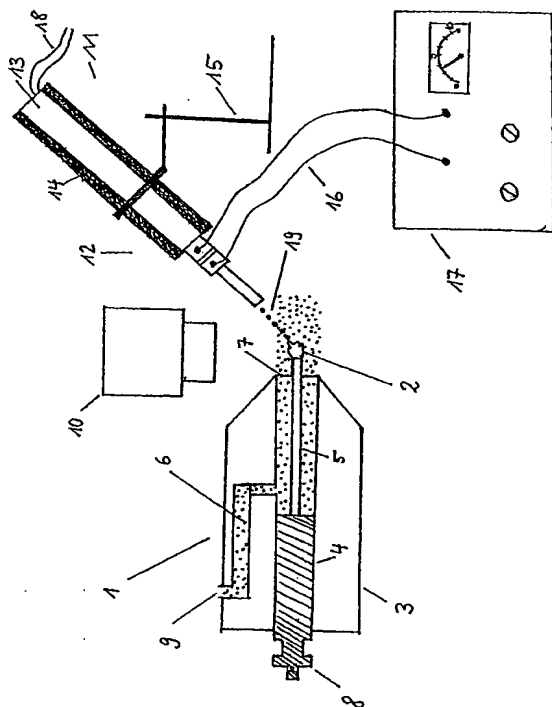
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **NEUEFEIND, Torsten**  
[DE/DE]; Am Weiher 3a, 82131 Gauting (DE). **BRAND-  
STETTER, Hans** [DE/DE]; Am Weiher 25, 82131 Gaut-  
ing (DE). **KIEFERSAUER, Reiner** [DE/DE]; Brodwastl-  
weg 9, 82061 Neuried (DE).

(74) Anwälte: **GRAF VON STOSCH, Andreas** usw.; Bosch,  
Graf von Stosch, Jehle, Flüggenstr. 13, 80639 München  
(DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING WEAKLY BINDING MOLECULE FRAGMENTS HAVING LIGAND PROPERTIES,  
WHEREBY THE MOLECULE FRAGMENTS ARE APPLIED IN THE FORM OF MICRODROPS OF A CORRESPONDING  
SOLUTION TO THE CRYSTAL

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SCHWACH BINDENDEN MOLEKÜLFRAGMENTEN MIT  
LIGANDENEIGENSCHAFTEN, WOBEI DIE MOLEKÜLFRAGMENTE ALS MIKROTROPFEN EINER ENTSPRECHENDEN  
LÖSUNG AUF DEN KRISTALL AUFGEBRACHT WERDEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for treating a crystal with a solution, whereby the solution contains one or more molecular species and the molecules of the molecular species typically have a molecular weight of < 500 Da. The use of this method enables weakly binding small molecules or molecule fragments to be identified on target structures and their binding position to be determined by subsequent x-ray crystallographic examinations.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Behandeln eines Kristalls mit einer Lösung, wobei die Lösung eine oder mehr Molekülspezies enthält und wobei die Moleküle der Molekülspezies typischerweise ein Molekulargewicht von < 500 Da aufweisen. Mit Hilfe dieses Verfahrens können auf Targetstrukturen schwach bindende kleine Moleküle oder Molekülfragmente identifiziert und deren Bindungsposition durch nachfolgende röntgenkristallographische Untersuchungen ermittelt werden.

WO 2005/017533 A1



(81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,

ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

IAP20 Rec'd PCT/PTO 06 FEB 2006

1

5

10

**VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SCHWACH BINDENDEN  
MOLEKÜLFRAGMENTEN MIT LIGANDENEIGENSCHAFTEN, WOBEI DIE  
MOLEKÜLFRAGMENTE ALS MIKROTROPFEN EINER ENTSPRECHENDEN LÖSUNG  
AUF DEN KRISTALL AUFGEBRACHT WERDEN**

15

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Behandeln eines Kristalls mit einer Lösung, wobei die Lösung eine oder mehr Molekülspezies enthält und wobei die Moleküle der Molekülspezies typischerweise ein Molekulargewicht von  $< 500$  Da aufweisen. Mit Hilfe dieser Verfahrens können auf Targetstrukturen schwach bindende kleine Moleküle oder Molekülfragmente identifiziert und deren Bindungsposition durch nachfolgende röntgenkristallographische Untersuchungen ermittelt werden.

25

Im Stand der Technik ist eine Vielzahl von Verfahren beschrieben, um mit Hilfe von in vitro Testverfahren oder auch mit Hilfe von Methoden zur Strukturaufklärung, beispielsweise über röntgenkristallographische Experimente oder NMR- Experimente, Liganden makromolekularer physiologischer Substanzen zu identifizieren und/oder zu charakterisieren. Derartige Target-Strukturen können bspw. insbesondere Proteine, die im Stoffwechsel, bei der intra- oder extrazellulären Signalweitergabe, beispielsweise als membranständige Rezeptoren, physiologisch Bedeutung haben, sein. Herkömmliche Verfahren zur Identifizierung derartiger Liganden setzen Substanzbibliotheken voraus, so dass eine große Vielzahl an Substanzen, die potentiell als Liganden für derartige Target-Strukturen in Betracht kommen, im Rahmen von entsprechenden Messungen eingesetzt werden müssen. Obwohl derartige Testmethoden im Hochdurchsatzverfahren („High-Throughput-Screening“, HTS) durchgeführt werden, haben

35 die Resultate derartiger Hochdurchsatzversuche, unabhängig davon, ob sie durch In-vitro-

Testverfahren oder ggf. auf strukturb biologischem Weg erfolgen, bislang nicht zu durchgreifenden Resultaten geführt. Neben einer Anzahl von weiteren Gründen mag für die vergleichsweise geringe Ausbeute an auf diese Weise im Hochdurchsatzverfahren identifizierten, neuen Leitsubstanzen für die Arzneimittelforschung, also der Identifizierung neuer Liganden, ausschlaggebend sein, dass nur auf Grund kleiner sterischer oder geometrischer Inkompatibilitäten der Testsubstanzen mit der Target-Struktur, z.B. im Bereich einer Bindungstasche oder auch im Eintrittsbereich („entry site“) in das Innere einer Struktur, bereits ein positives Signal (beispielsweise ein Signal, das die Bindung der Testsubstanzen an die Target-Struktur indiziert) unterbleibt, obwohl bereits geringfügigste strukturelle Modifizierungen der Testsubstanzen zu einem Bindungssignal geführt hätten.

Um derartige experimentelle Fehlschläge zu vermeiden, ist im Stand der Technik das Konzept entwickelt worden, Hochdurchsatz-Testverfahren mit Testsubstanzen, deren sterische Flexibilität erhöht ist, durchzuführen. Eine Möglichkeit, eine größere Trefferquote bei Hochdurchsatzverfahren zur Ermittlungen von bindenden Leitsubstanzen zu erreichen, besteht darin, Teilstrukturen chemischer Verbindungen (sog. „Fragmente“ klassischer bspw. organisch-chemischer Moleküle) als Testsubstanzen einzusetzen („fragmentorientierter Ansatz“). Im Anschluß werden einzelne an die Target-Struktur in Nachbarschaft gebundene Fragmente über Linkerelemente chemisch miteinander kombiniert und damit durch Kombination kleiner oder kleinster Fragmente bausteinartig Leitsubstanzen mit Liganden-Eigenschaft zusammengesetzt.

Um einerseits solche an die Target-Struktur gebundenen Fragmente zu identifizieren, die in räumlicher Nähe zueinander liegen und um andererseits in stereo-chemisch sinnvoller Weise Linker-Strukturen zwischen den einzelnen gebundenen Fragmenten konstruieren zu können, die im Einklang mit den Strukturvorgaben des Targets stehen, ist es für den fragmentbasierten Ansatz jedoch erforderlich, Strukturinformationen zum Bindungsplatz mindestens eines, vorzugsweise mehrerer Fragmente auf der Target-Struktur zu gewinnen.

Hierbei sind im Stand der Technik Computer-basierte Verfahren beschrieben, mit deren Hilfe Fragmente zu neuen potentiellen Liganden einer Target-Struktur zusammengesetzt werden können. Ein derartiger computereexperimenteller Ansatz wird bspw. von Wang et al. (Journal

of Molecular Modeling, 2000, 6, 498) offenbart, wobei kleine Strukturabschnitte, also die Fragmente, zunächst ausgewählt und dann schrittweise in bspw. der Bindungstasche der Target-Struktur kombiniert werden. Zahlreiche Programme oder Programmpakete, die ein derartiges – in der Literatur als „de novo-Design“ beschriebenes Vorgehen ermöglichen, sind im Stand der Technik verfügbar, beispielsweise die Programme GROW (Moon et al., Proteins, 1991, II, 314), LUDI (Bohm, J. Comp.-aided Molec. Des., 1992, 6, 61), LEAPFROG (Cramer, integrated in the SYBYL program package, 1996, Tripos, St. Louis, MO, USA), PROLIGAND (Clark et al, J. Comp.-aided Molec. Des., 1995, 9, 13 oder 213; Clark et al., J. Chem. Inf. Comput. Sci., 1995, 35, 914). Derartige computerexperimentelle Ansätze haben jedoch grundsätzlich den Nachteil, dass computerexperimentelle Ergebnisse nur bedingt die realen Verhältnisse abbilden und stets laborexperimentell überprüft werden müssen. Auch kleine Abweichungen bei der Simulation der zwischen den Fragmenten und der Targetstruktur bestehenden Interaktionen durch die im Computerexperiment getroffenen theoretischen Annahmen, bspw. bei den eingesetzten Kraftfeldern, können zu in der Praxis völlig irrelevanten Ergebnissen bei der Computer-experimentellen Leitsubstanzidentifizierung führen.

Strukturinformationen der erforderlichen Art zur Durchführung eines fragmentbasierten Ansatzes können allerdings auch durch reale Experimente mit der Target-Struktur mit Hilfe biophysikalischer Verfahren, beispielsweise mit Hilfe der Röntgenkristallographie (Blundell, 2002) erhalten werden. Im Stand der Technik sind Verfahren vorbeschrieben, die einen fragmentbasierten Ansatz in Kombination mit röntgenkristallographischen Experimenten beschreiben. So etwa wird von Nienaber (Nature Biotechnology vol. 18, 2000, 1105 ff.) ein kristallographisches „Screening“-Verfahren offenbart, das auf einer „Soaking“-Technik beruht, d.h. bei welchem die Target-Struktur, insbesondere also ein Target-Protein, in kristallisierter Form vorliegt und der Proteinkristall einer Lösung ausgesetzt wird, die verschiedene Fragmente, d.h. chemische Teilstrukturen, wie z.B. substituierte Phenylringe oder substituierte bizyklische Ringsysteme, enthält. Die jeweilige Elektronendichte der einzelnen Komponenten in der Lösung ist bekannt, so dass spezifische Elektronendichten, die nach röntgenkristallographischen Experimenten mit dem „gesoakten“ Kristall erhalten werden, eindeutig einzelnen in der „Soaking“-Lösung enthaltenen Fragmenten zugeordnet werden können. Durch einen Vergleich der Elektronendichtekarten vor dem „Soaking“ des Kristalls und nach dem „Soaking“ des Kristalls wird es möglich, in einer Differenzelektronendichtekarte Bindungs-

- plätze der Fragmente auf der Target-Struktur zu identifizieren. Schließlich können dann nach Maßgabe stereochemischer Vorgaben die einzelnen Fragmente zu einem potentiellen Liganden zusammengesetzt werden. Diese von Nienaber et al. entwickelte Form des „Screenings“ von chemischen Fragmenten zur Entwicklung von neuen Liganden ist jedoch in seiner Anwendung beschränkt. Nicht nur ist bei einem derartigen Verfahren ein „Soaking“-Schritt dem röntgenkristallographischen Experiment vorgeschaltet, welches Schwierigkeiten aufwerfen kann. Bspw. kann nicht nur die für das nachfolgende röntgenkristallographische Experiment erforderliche Unversehrtheit des Kristalls durch das „Soaking“ beeinträchtigt werden, sondern der beschriebene Ansatz kann auch nicht den Anforderungen eines Hochdurchsatzexperiments gerecht werden. Insbesondere müssen die einzelnen in der „Soaking“-Lösung enthaltenen Fragmente aufgrund ihrer jeweiligen Elektronendichte unterscheidbar sein, so dass die ohnehin der Zahl nach beschränkten Fragmente in einer „Soaking“-Lösung auch spezifisch ausgewählt werden müssen.
- 15 Ein weiterer Nachteil der vorbeschriebenen Vorgehensweise ist jedoch auch die Tatsache, dass einem solchen Verfahren auch die geringe Bindungsaffinität der kleinen Fragmente an die Target-Struktur entgegensteht. Dieser Nachteil liegt indes auch einer weiteren alternativen Methode, die Bindung von Fragmenten an z.B. Protein-Targets röntgenkristallographisch zu untersuchen, zugrunde. Bei dieser Alternative werde die Fragmente bereits mit einem Target, z.B. Protein, zum Erhalt eines Cokristalls kristallisiert. Darüber hinaus erweist sich ein solches Verfahren für den Hochdurchsatz als ungeeignet, da eine Co-Kristallisation mit jedem einzelnen Fragment erfolgen muss, so dass eine Vielzahl von Co-Kristallen erzeugt werden muß, um die Fragmentbindungsplätze röntgenkristallographisch bestimmen zu können.
- 25 Von Lesuisse et al. (J. Med. Chem. 2002, 45, 2379) wird ein alternatives Verfahren offenbart, mit dem gleichfalls experimentell ein fragmentorientierter Ansatz verfolgt wird, wobei das Verfahren allerdings seiner Struktur nach die Verfeinerung von Wirkstoffen zum Ziel hat und nicht der Wirkstoffidentifizierung als solcher im engeren Sinn dient.
- 30 Obwohl also röntgenkristallographische Verfahren inzwischen in vielen Bereichen als Screening-Methode eingesetzt werden können, sind bislang keine Verfahren verfügbar, die mit hoher Ausbeute die Identifizierung von neuen Liganden fragmentbasiert erlauben könnten.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, das mit Hilfe röntgenkristallographischer Methoden dazu geeignet ist, an die Target-Struktur nur schwach bindende Fragmente zu identifizieren und auf diesem Weg die Identifizierung neuer Liganden, die als Arzneimittelwirkstoffe in Betracht kommen könnten, in - verglichen mit dem Stand der Technik großer Ausbeute - erlaubt.

Diese Aufgabe wird durch ein erfindungsgemäßes Verfahren nach Anspruch 1 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltung dieses erfindungsgemäßen Verfahrens sind in den Unteransprüchen enthalten.

10

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren zum Behandeln eines Kristalls mit einer Lösung, enthaltend eine oder mehr Molekülspezies, wobei die Moleküle der einen oder mehr Molekülspezies ein Molekulargewicht von  $< 500$  Da aufweisen, mit den folgenden Schritten gelöst: (a) es wird der Kristall auf einer Halterungsvorrichtung befestigt und danach werden (b) Mikrotropfen der Flüssigkeit auf den Kristall aufgebracht. Eine vorteilhafte, verfahrensgemäß einsetzbare Halterungsvorrichtung ist in der Anmeldung offenbart.

15

Die auf den Kristall aufgebrachten Lösungen enthalten also typischerweise kleine Moleküle oder Molekülfragmente, beispielsweise substituierte Ringverbindungen, aromatisch oder nicht-aromatisch, ggf. auch als Heterozyklen (bspw. Imidazol, Thiazol, Purin, Pyrimidin, Pyridyl etc), oder aus der organischen Chemie bekannte kleine lineare Fragmente, die ggf. auch typische funktionelle Gruppen aufweisen können, beispielsweise eine oder mehr Amino- oder Carboxyl- oder Carbonyl- oder Aldehyd- oder Nitro- oder Hydroxyfunktionen, ggf. auch hydrophobe Alkylgruppen (verzweigt oder unverzweigt). In der aufgetragenen Lösung kann eine derartige Molekülspezies enthalten sein, also nur beispielsweise eine Spezies eines spezifischen substituierten Phenylrings oder aber es können auch zwei oder mehr oder derartige Spezies in der Lösung auftreten. Die in der Lösung enthaltenen Moleküle oder Molekülfragmente werden vorteilhafterweise ein Molekulargewicht  $< 200$  Da aufweisen, weiter bevorzugt von  $< 100$  Da. Schließlich sind Fragmente bevorzugt, die eine Bindungsaffinität an den Zielstruktur zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-5}$  M aufweisen, besonders bevorzugt zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  M. Die Fragmente weisen vorteilhafterweise eine Struktur auf, die es erlaubt, Wechselwirkungen mit der Zielstruktur auszubilden, bspw. eine hydrophobe Wechselwirkung, eine Wasserstoff-

20

25

30

brücke und/oder eine aromatische-aromatische Wechselwirkung. Besonders bevorzugt sind solche Fragmente, die mindestens eine funktionelle Gruppe, wie vorstehend genannt, aufweisen. Weiterhin werden Fragmente, die in der auf den Kristall aufzubringenden Lösung eingesetzt werden, typischerweise nicht mehr als 3 frei rotierbare Bindungen aufweisen, ganz besonders typisch 2 oder 3 frei rotierbare Bindungen.

Bei dem Kristall, der mit der Lösung behandelt wird, wird es sich um einen Kristall mit einer Targetstruktur handeln, typischerweise um einen Proteinkristall, wobei der Kristall die kristallisierten Targetstrukturen in jeder denkbaren Raumgruppe enthalten kann. Beispielsweise können die kristallisierten Strukturen in einer hexagonalen, kubischen, monoklinen, tetragonalen, triklin oder trigonalen auftreten.

Der Kristall kann grundsätzlich auf jeder beliebigen Halterungsvorrichtung aufgebracht werden, besonders bevorzugt sind jedoch solche Halterungsvorrichtungen, wie sie etwa in der deutschen Patentschrift DE 198 42 797 C1 beschrieben sind, welche Bestandteil der vorliegenden Offenbarung ist. Hierbei wird der Kristall in der Art des „Free Mounting Systems“ auf der Halterungsvorrichtung befestigt („frei montierter“ Kristall). Bei einem frei montierten Kristall handelt es sich i.S. der Erfindung um einen solchen Kristall, der nicht – wie beim „Soaking“ nach dem Stand der Technik – sich in einer flüssigen Umgebung befindet bzw. in eine solche eingetaucht ist. Vielmehr wird, um jegliche Veränderungen des Kristalls während seiner Verweilzeit auf der Halterungsvorrichtung ausschließen zu können, der Kristall vorteilhafter Weise bei einem erfindungsgemäßen Verfahren in einer definierten Umgebung gehalten, die beispielsweise die entsprechende definierte Feuchte, die der Kristall benötigt, um seine Struktur während des Behandlungs- bzw. Messvorgangs zu wahren, bereitstellt. Die entsprechende konstant bleibende Umgebung des Kristalls kann beispielsweise mit Hilfe eines Gasstroms definierter Zusammensetzung erzeugt werden, wobei vorzugsweise der Gasstrom aus einem Luftstrom mit kontrollierter Luftfeuchtigkeit besteht. Derartige Verfahren zur Sicherstellung einer gleichbleibenden Umgebung des Kristalls sind in der DE 102 32 172.8 beschrieben und werden insoweit vollinhaltlich in die vorliegende Offenbarung einbezogen.



Der Kristall wird nach dem erfindungsgemäßen Verfahren mit Mikrotropfen behandelt, wobei die Behandlung vorzugsweise mit einer Vorrichtung, die ein „Mikrodosiersystem“ aufweist, erfolgt, wie sie nachfolgend in der vorliegenden Anmeldung beschrieben wird.

- 5 Das Aufbringen der Lösung auf den Kristall kann ohne eine entsprechende definierte Umgebung erfolgen oder es kann gleichzeitig mit dem Auftropfen, wie oben beschrieben, vorzugsweise eine gleichmäßige Umgebung mit Hilfe eines beispielsweise Gasstroms, hergestellt werden. Wird die kleine Moleküle oder Molekülfragmente enthaltende Lösung gleichzeitig mit dem Gasstrom aufgetropft, ist eine Abstimmung zwischen der Zufuhr des beispielsweise
- 10 Gasstroms und der Art des Auftropfvorgangs bevorzugt. Hierbei wird typischerweise ein aufeinander abgestimmter Regelmechanismus eingesetzt werden, um Flüssigkeits- bzw. Volumensveränderungen oder andere störende Einflüsse zu vermeiden. Ganz besonders bevorzugt ist es dann, wenn etwa die Luftfeuchtigkeit des Gasstroms und die Frequenz, mit der die Tropfen durch das Mikrodosiersystem auf den Kristall aufgetropft werden, während des Auftropfens so aufeinander abgestimmt werden, daß der Kristall möglichst wenig belastet wird.
- 15 Bevorzugt ist es in diesem Zusammenhang, wenn der das Volumen des Kristalls, das ggf. mit Hilfe einer Flächenprojektion kontinuierlich überwacht werden kann, nicht mehr als 40%, vorzugsweise nicht mehr als 20% und noch stärker bevorzugt nicht mehr als 10% vom Ausgangsvolumen abweicht.

20

- Der beispielsweise zur Aufrechterhaltung einer gleichbleibenden Atmosphäre um den Kristall herum verwendete Gasstrom kann mindestens eine weitere funktionale Komponente enthalten, beispielsweise einen Lösungsvermittler, der die auf den Kristall aufzubringende Substanz in Lösung hält und damit das Eindringen der Substanz in den Kristall verbessert. Auch andere
- 25 Komponenten, die bspw. die Ausfällung der Fragmente auf dem Kristall vermeiden, werden bevorzugt zugeführt.

- Die auf den Kristall aufgetragenen Mikrotropfen sind typischerweise kleiner als das Volumen des behandelten Kristalls, vorzugsweise weist ein solcher Mikrotropfen ein Volumen zwischen 1 nl und 100 pl, bevorzugt zwischen 100 pl und 20 pl und noch stärker bevorzugt zwischen 20 pl und 4 pl auf. Derartige Tropfengrößen werden durch ein Mikrodosiersystem auf
- 30 den Kristall aufgebracht, wie es nachfolgend in der vorliegenden Anmeldung als Vorrichtung

beschrieben wird und im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzt werden kann.

Typischerweise wird ein erfindungsgemäßes Verfahren durchgeführt, indem die die Molekül-  
5 spezie enthaltende und auf den Kristall aufgebrachte Lösung eine wässrige Lösung oder zu-  
mindest eine teilweise ein organisches Lösungsmittel umfassende Lösung ist. Derartige orga-  
nische Lösungsmittel können, sofern mit der wässrigen Lösung mischbar, einen Volumensan-  
teil von mindestens 5-% der aufgebrachten Lösung ausmachen, vorzugsweise zwischen 5 und  
95 Vol.-% der aufgebrachten Lösung. Bevorzugt wird der Anteil des organischen Lösungs-  
10 mittels zwischen 20 und 80 Vol.-% liegen, ganz besonders bevorzugt zwischen 30 und 70  
Vol.-%. Grundsätzlich können also als aufzubringende Lösung Mischungen aus Wasser und  
mindestens einem organischen Lösungsmittel eingesetzt werden.

Die Lösung, die die mindestens eine Molekülspezies enthält, kann aber auch ein organisches  
15 Lösungsmittel ohne Beimengungen von Wasser sein. Ganz besonders bevorzugt sind solche  
Lösungen, die ein weitgehend vollständig flüchtiges Lösungsmittel umfassen, wodurch ein  
Akkumulieren der einen oder mehr aufgebrachten Molekülspezies auf dem Kristall möglich  
wird, wenn die Auftragungskinetik der aufgetragenen Lösung entsprechend an die Abdampf-  
kinetik des flüchtigen Lösungsmittels angepaßt wird. Insbesondere vorteilhaft ist das erfin-  
20 dungsgemäße Verfahren im Hinblick auf die zu erreichenden Konzentrationen der Moleküle  
oder Molekülfragmente, wobei die Konzentration einer Molekülspezies im entsprechend vor-  
zugsweise frei montierten Kristall in einem Bereich von ca.  $10^{-1}$  bis  $10^{-3}$  M in einer vorteilhaf-  
ten Ausführungsform liegt. Typischerweise liegt die akkumulierte Konzentration der Molekü-  
le oder Molekülfragmente in einem Bereich von ca.  $7 \times 10^{-1}$  bis  $3 \times 10^{-2}$  M.

25

Organische Lösungsmittel als Trägerflüssigkeit der aufzubringenden Lösung zu verwenden,  
ist auch deshalb besonders vorteilhaft, weil die aufzubringenden Moleküle oder Molekülfrag-  
mente aufgrund ihrer hydrophoben oder partiell hydrophoben Eigenschaften in wässriger  
Lösung nur schwer löslich sind und daher in einer wässrigen Lösung typischerweise nicht auf  
30 den Kristall aufgetropft werden können. Besonders vorteilhafte Lösungsmittel als Trägerflüs-  
sigkeit der aufzubringenden Lösung sind solche organischen Lösungsmittel, die bei einer  
Temperatur von weniger als  $100^{\circ}\text{C}$  siedend und (vorzugsweise zu mindestens 70%, noch stär-

ker bevorzugt zu mindestens 80%, am stärksten bevorzugt zu mindestens 90%) flüchtig sind. Im Falle des Einsatzes von nicht-wässrigen Lösungsmitteln kann es sich um Mischungen von mindestens zwei organischen Lösungsmitteln handeln oder um reine organische Lösungen. Die Lösungsmittel können bspw. ausgewählt sein aus einer Gruppe, bestehend aus DMSO, 5 Trifluorethanol, Aceton, Chloroform, Ethanol und/oder Methanol.

Wie oben erwähnt, wird vorzugsweise, um einen Kristall während seiner Verweildauer auf der Halterungsvorrichtung in einer konstanten Umgebung zu halten, ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zusp eisung von Lösungsmittel und einem Feuchtestrom einerseits und dem 10 Abdampfen von Kristallflüssigkeit bzw. dem als Trägerflüssigkeit dienenden Lösungsmittel der aufgetragenen Lösung andererseits angestrebt. Bevorzugt ist es hierbei, wenn das Abdampfen des Kristallwassers, das zu einem Austrocknen des Kristalls führen kann, durch einen zumindest teilweise wasserhaltigen Feuchtestrom kompensiert werden kann. Alternativ oder ggf. zusätzlich kann das Kristallwasser auch durch Aufbringen von Flüssigkeit eines Mikrodosier- 15 systems der nachfolgend beschriebenen Art ausgeglichen werden. Hierbei kann es sich um ein Mikrodosiersystem handeln, mit dem auch die Moleküle oder Molekülfragmente in Lösung aufgebracht werden oder auch um mindestens ein weiteres Mikrodosiersystem, dessen Aufgabe nicht das Aufbringen von Molekülspezies, sondern ausschließlich die (besonders bevorzugte wässrige) Lösungsmittelzusp eisung ist.

20 Um das dynamische Gleichgewicht herzustellen, sollte der Kristall während des Behandlungsvorgangs beobachtet werden, insbesondere sollte gegebenenfalls eine Volumenzunahme des Kristalls ermittelt werden. Diese Volumenzunahme könnte darauf beruhen, dass das die Moleküle enthaltende Lösungsmittel(gemisch) in erhöhtem Maße in den Kristall hineindif- 25 fundiert, wobei osmotische Effekte des Feuchtestroms gleichfalls eine Volumenzunahme bewirken können. In einer bevorzugten Ausführungsform wird während der Behandlung des Kristalls die Flächenprojektion desselben zur Beobachtung der Volumensentwicklung mitverfolgt. Idealerweise beträgt die Zunahme der Flächenprojektion des Kristalls weniger als 20 %, noch stärker bevorzugt weniger als 10 %. Gleichwohl kann auch, ohne dass eine kritische 30 Zunahme des Kristallvolumens im Wege der Flächenprojektion beobachtet wird, die mikroskopische Ordnung des Kristalls durch das Austropfen der Lösung gefährdet werden. Bevorzugt im Rahmen des vorliegenden Verfahrens werden daher Röntgendiffraktionsexperimente

durchgeführt, wobei das Beugungsbild eine Aussage über die mikroskopische Ordnung zulässt. Besonders bevorzugt werden die Röntgendiffraktionsexperimente in einer zeitlichen Abfolge regelmäßig durchgeführt, so dass dieser Parameter während des Auftragens unter Beobachtung bleibt.

5

Zur Herstellung des dynamischen Gleichgewichts müssen weiterhin neben dem Tropfenvolumen auch die Menge der aufgetragenen Lösung (welche wiederum von der Konzentration der in der Lösung enthaltenen Molekülspezies abhängt, wobei schließlich wiederum die erforderliche Konzentration der Molekülspezies von der Konzentration der Proteinbindungsstellen im Kristall bestimmt wird) berücksichtigt werden. Abhängig von der Tropfengröße, welche beispielsweise über eine stroboskopische Tropfenprojektion vermessen werden kann, ergibt sich für die Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens die benötigte Tropfenanzahl. Zur Ermittlung der Konzentration der Molekülspezies in der Lösung wird, da diese von der Anzahl der Proteinbindungsstellen im Kristall abhängig ist, die Annahme getroffen, dass die Proteinkristalle einen Wassergehalt von typischerweise ca. 50 % im Proteinkristall aufweisen. Unter Verwendung des Molekulargewichts des Proteins und unter Berücksichtigung der Bindungsstellen im Einzelprotein kann die Konzentration der Bindungsstellen im Kristall errechnet werden.

20 In der aufzubringenden Lösung kann nur eine Molekülspezies, d.h. eine Art eines Moleküls oder eines Molekülfragments enthalten sein, ebenfalls können aber auch verschiedene Moleküle oder Molekülfragmente und damit mehr als eine Molekülspezies in einer solchen Lösung enthalten sein. Es handelt sich dann um einen sog. „Cocktail“-Ansatz in der aufzubringenden Lösung. Hierbei sollten die miteinander kombinierten verschiedene Molekülspezies, vorzugsweise mindestens zwei, stärker bevorzugt mindestens drei, noch stärker bevorzugt mindestens zehn, noch stärker bevorzugt mindestens zwanzig und am stärksten bevorzugt mindestens fünfzig verschiedene Molekülspezies, eine vergleichbare Löslichkeit in dem gewählten Lösungsmittel(gemisch) aufweisen. Weiter ist es bevorzugt, dass in einem solchen Cocktail-Ansatz die einzelnen Molekülspezies nicht miteinander interagieren oder reagieren, sondern  
30 auch als solche monodispers jeweils weiter in der Lösung enthalten sind.

Vorteilhaft für die Zusammensetzung eines Fragmentcocktails, der im Rahmen der vorliegenden Erfindung eingesetzt wird, ist daher eine ähnliche Lösbarkeit der im Cocktail enthaltenen Fragmente. Insbesondere sollten die im Cocktail eingesetzten Fragmente nicht weniger als  $1/5$  der mittleren Löslichkeit bzw. nicht mehr als die 5-fache mittlere Löslichkeit der anderen im Cocktail enthaltenen Fragmente aufweisen. Vorteilhaft ist es weiterhin, wenn die Fragmente im Cocktail ihrer Struktur nach Unterschiede aufweisen bzw. sich bezüglich ihres Streuverhaltens unterscheiden, so dass röntgenkristallographisch die einzelnen, ggf. im Kristall gebundenen Fragmente eindeutig identifiziert werden können. Weiterhin bevorzugt ist es, wenn die im Cocktail enthaltenen Fragmente unterschiedliche physikochemische Eigenschaften aufweisen, um ausschließen zu können, dass die Fragmente um dieselbe Bindungsstelle im Zielprotein konkurrieren. Insoweit ist es vorteilhaft, wenn die Fragmente - stereochemisch voneinander abweichend - ein jeweils typisches Muster an funktionellen Merkmalen aufweisen, bspw. eine für jede Fragmentspezies charakteristische strukturelle Anordnung von ggf. verschiedenen funktionellen Gruppen oder Interaktionsparametern (bspw. eine aromatische Gruppe für Stapeleffekte („stacking“) oder Wasserstoffbrückenbindungsgruppen). Auf diese Weise kann mit Hilfe eines Fragmentcocktails im Rahmen eines erfindungsgemäßen Verfahrens eine möglichst große Anzahl an strukturell unterschiedlichen Ligandenfragmenten, die an verschiedene Bereiche innerhalb der Bindungstasche des Zielproteins binden können, getestet werden, wobei diese Fragmente Bestandteil eines auf deren Basis entwickelten, die Bindungstasche besetzenden Liganden sein können.

Darüber hinaus können die Fragmente, bspw. auch die Fragmente in einem Cocktailansatz, chemisch so modifiziert sein bzw. so gewählt werden, dass alle (oder zumindest ein Teil der Fragmente) die Eigenschaft besitzen, anomal Röntgenstrahlen zu streuen bzw. elektronenreiche Zentren aufzuweisen. Derartige elektronenreiche Zentren können bspw. Schwer(metall)atome (bspw. Kupfer-, Selen-, Quecksilber-, Goldatome) sein, die mit den Fragmenten derivatisiert werden bzw. an diese konjugiert sind. Auf diese Weise kann ein ohne derartige elektronenreiche Zentren nur schwach streuendes Fragment im Zielprotein röntgenkristallographisch ohne weiteres erkannt und topographisch zugeordnet werden. Diese Derivatisierung mit bspw. Schwermetallatomen wird insbesondere bei kleinen Fragmenten mit einem Molekulargewicht von weniger als 200 Da, insbesondere weniger als 100 Da bevorzugt sein, um die Fragmente röntgenkristallographisch erfassen zu können.

Insgesamt also kann durch ein erfindungsgemäßes Verfahren, unabhängig von der Umgebung in einer Mutterlösung, wie in allen Experimenten nach dem Stand der Technik, ein frei montierter Kristall auf vorteilhafte Weise mit einem Liganden bzw. Ligandenfragment komplexiert werden. Auf diese erfindungsgemäße Weise können Proteinkristalle auch in solchen Fällen,  
5 die mit den Verfahren nach dem Stand der Technik nicht mit Liganden komplexierbar sind, dennoch eine Komplexbildung eingehen. Die Ursache für die Überlegenheit des erfindungsgemäßen Verfahrens, das einen frei montierten Kristall und die Bereitstellung eines Mikro(Piko)tropfens durch Verwendung einer entsprechenden Vorrichtung voraussetzt, ist die Verschiebung des Gleichgewichts der Reaktion zwischen Ligand und kristallisiertem Protein  
10 zum komplexierten Protein. Dies wiederum hängt mit der Reduktion der apparenten Dissoziationskonstante  $K_D$  zusammen, da die Konzentration der freien Komponenten durch die Isolation der Proteinkristalle von der den Kristall (nach dem Stand der Technik) umgebenden Mutterlauge erheblich eingeschränkt ist. Diese Reduktion der  $K_D$  erlaubt es auch dann Komplexe zu erhalten, wenn die Bindungskonstante des Liganden an das kristallisierte Protein  
15 eigentlich gering ist oder der Ligand bzw. das Ligandenfragment nur schwach löslich ist und daher Verfahren nach dem Stand der Technik (Kristall in Mutterlösung) keine oder nur eine geringfügige Komplexbildung (die für röntgenkristallographische Folgeexperimente nicht ausreichend ist) ergeben.

20 Darüber hinaus ist es von erheblicher Bedeutung, bei der Komplexbildung nicht nur die erfindungsgemäß vorteilhafte Verschiebung des Gleichgewichts der Komplexbildungsreaktion zu betrachten, sondern auch die durch das erfindungsgemäße System mit frei montiertem Kristall vorteilhafte Kinetik der Komplexbildung, insbesondere bei schwach löslichen Liganden. Der erfindungsgemäß frei montierte Kristall (ohne die Umgebung einer Mutterlösung) hat  
25 eine größere Stabilität als der in der Mutterlösung nach dem Stand der Technik „gesoakte“ Proteinkristall. Diese größere Stabilität kann genutzt werden, um bspw. die Komplexbildung des Liganden, mit dem besonders bevorzugten Ziel mindestens 90%iger, vorzugsweise mindestens 95%iger Absättigung der im Kristall für den Liganden enthaltenen Bindungsplätze, durch die Verwendung von Verfahren zu erzwingen, denen ein Proteinkristall im Falle des  
30 „Soakings“ oder der Kokristallisation nach dem Stand der Technik nicht zugänglich wären. Insbesondere vorteilhaft in diesem kinetischen Zusammenhang ist die Verwendung von auf Temperaturen oberhalb von 20°C erwärmter Liganden- bzw. Fragmentlösung, die als Pi-

kotropfen auf den frei montierten Kristall aufgetragen wird. Diese Erwärmung kann bspw. mindestens 30°C, vorzugsweise mindestens 40°C, noch stärker bevorzugt mindestens 50°C betragen. Auch eine Erwärmung bis zu 75°C ist möglich. Darüber hinaus oder in Kombination mit der Erwärmung der Ligandenlösung kann diese auf den Kristall, bspw. direkt aufgespritzte, als Pikotropfen aufgetragene Ligandenlösung auch organische Lösungsmittel enthalten oder aus diesen bestehen. Sofern das organische Lösungsmittel mit Wasser löslich ist (bspw. DMSO oder TFE) kann dieses zu mindestens 20 Vol.-%, vorzugsweise zu mindestens 40 Vol.-% und noch stärker bevorzugt zu mindestens 50 Vol.-% in einem Wasser/organisches Lösungsmittel-Gemisch enthalten sein. Auch kann der Ligand in einem reinen organischen Lösungsmittel oder in einem Gemisch verschiedener organischer Lösungsmittel gelöst und als Mikrotropfen auf den frei montierten Kristall (siehe hierzu a.a.O.) aufgetragen werden. Der Einsatz organischer Lösungsmittel, der wiederum nur durch die erfindungsgemäße Verwendung eines frei montierten Kristalls und eines Mikrotropfens möglich wird, ist insbesondere dann bevorzugt, wenn die Liganden oder Ligandenfragmente in wässriger Lösung nur schwer oder unlöslich sind. Schließlich kann der frei montierte Kristall auch einem Verdampferstrom ausgesetzt sein, wobei über einen Verdampfer organisches Lösungsmittel oder ein organische Lösungsmittelgemisch verdampft wird. Auf diese Weise wird das organische Lösungsmittel, bspw. DMSO oder Chlorkohlenwasserstoff, auf/im Kristall angereichert und dadurch die Löslichkeit des in Wasser schwer löslichen Liganden erhöht.

Schließlich kann das erfindungsgemäße Verfahren in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform auch dazu eingesetzt werden, die Phasenbestimmung von solchen kristallisierten Zielproteinen zu ermöglichen, die strukturell noch nicht aufgeklärt wurden. Hierzu bedient man sich bspw. der Bestimmung der Phasen über anomale Streumethoden bzw. mit Hilfe von Schwermetallatomderivaten des Zielprotein. Derartige Schwermetallatome können als solche im Protein gebunden sein oder als Komplex im Protein vorliegen. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt es, die Schwermetallatome oder deren Komplexe als Fragmente im Sinne der vorliegenden Erfindung einzusetzen und deren Bindung bzw. deren Bindungsort im Protein zu bestimmen und hierdurch die für die röntgenkristallographische Strukturaufklärung erforderliche Phaseninformation zu gewinnen. Derartige Schwermetallatome oder deren Komplexe können erfindungsgemäß auch im Cocktailansatz auf den Proteinkristall aufgebracht werden. Ein erfindungsgemäßes Verfahren eignet sich insbesondere deshalb zur sys-

tematischen Schwer(metall)atomderivatisierung, weil die Schwer(metall)atome oder deren Verbindungen oder Komplexe nur schwach (mit geringer Affinität) an die Zielproteine binden und/oder häufig nur schwerlöslich in wässrigen Lösungen sind. Gerade diese Nachteile werden aber durch das erfindungsgemäße Verfahren überwunden.

5

Ein besonderer Vorteil eines erfindungsgemäßen Verfahrens besteht weiterhin darin, dass mit Hilfe der Zugabe eines Cocktails verschiedener (Fragment)molekülspezies synergistische Effekte einzelner Spezies auf die Zielstruktur aufgedeckt und für die Identifizierung eines Liganden oder Inhibitors, der die einzelnen Fragmente, ggf. über Linker miteinander verbunden, enthält, entsprechend berücksichtigt werden können. Vielfach unterliegen die Zielproteine, für die Fragmente von Liganden oder Inhibitoren durch das erfindungsgemäße Verfahren identifiziert werden sollen, einer strukturellen Veränderung nach Bindung eines Liganden („induced fit“). In solchen Fällen ist mit einer signifikanten Abhängigkeit der Bindungsmodi bei der gleichzeitigen Verwendung verschiedener aktiver Fragmente zu rechnen. Derartige strukturelle Abhängigkeiten können durch die Verwendung von Fragmentcocktails im Rahmen erfindungsgemäßer Verfahren systematisch untersucht werden. Regelmäßig ist als Folge des „induced fit“ nach Bindung eines Fragments zu erwarten, dass eine Strukturveränderung im Protein eintritt und erst dann ein oder mehr weitere/s Fragment/e an das Protein binden können. Während die Zugabe größerer Liganden (enthaltend mehrere Fragment) auf Grund bspw. seiner strukturellen Starrheit keine Bindungsaffinität an die Proteine im Kristall erkennbar erscheinen läßt, wird die Bindung einzelner isolierter Fragmente des größeren Liganden möglich (auf Grund ihrer vergleichsweise geringen Größe können diese an die Zielstruktur binden, obwohl diese eine Strukturänderung durchmacht). Es lassen sich somit die durch den „induced fit“ vorgegebenen Strukturveränderungen der Zielstruktur (und die damit gegenüber dem größeren Liganden zu modifizierenden Linker zwischen den Fragmenten) erkennen und für das Inhibitor-design berücksichtigen.

30

Ein erfindungsgemäßes Verfahren der vorstehenden Art kann Bestandteil des Verfahrens zur Ermittlung einer kristallographischen Struktur eines Komplexes von einer Target-Struktur, beispielsweise eines Proteins, und von mindestens einer Molekülspezies sein. In einem solchen Verfahren wird zunächst das vorbeschriebene erfindungsgemäße Verfahren mit seinen Verfahrensschritten durchgeführt und danach oder zugleich wird auf dem Fachmann bekannt-



te Weise der verfahrens- und erfindungsgemäß behandelte Kristall mit Röntgenstrahlung oder Synchrotronstrahlung bestrahlt, so dass schließlich das Beugungsbild des Kristalls aufgenommen werden kann, d.h. die Datensammlung der im Beugungsbild auftretenden Reflexe erfolgen kann.

5

Aus der Datensammlung, d.h. den Intensitäten der beobachteten Reflexe, kann dann in einem weiteren Verfahrensschritt eine Elektronendichtekarte errechnet werden, wobei hierfür Phaseninformation benötigt wird. Diese Phaseninformation kann durch andere Techniken bereitgestellt werden, bspw. durch Schwermetallatomderivate, die die Phaseninformation verschaffen („isomorphous replacement“) oder durch Methoden des „multiple anomalous scattering (MAD)“ (Stout und Jensen, 1989, John Wiley, New York). Besonders bevorzugt sind allerdings die Verfahren des „molecular replacement“, da ein erfindungsgemäßes Verfahren regelmäßig mit an sich bekannten dreidimensionalen Strukturen von Targets durchgeführt wird und daher die Phaseninformation der Targetstruktur (ohne die verfahrensgemäß aufgetropften Liganden) bereits verfügbar ist. Besonders bevorzugt kann die Positionierung der gebundenen Moleküle oder Molekülfragmente, also der Testsubstanzen mit Liganden-Eigenschaft, in der Targetstruktur dann ermittelt werden, wenn eine Differenzelektronendichtekarte errechnet wird. Hierzu wird die Differenz in der Elektronendichte zwischen komplexierter und nicht-komplexierter Targetstruktur ermittelt, wobei die verbliebene Elektronendichte gerade der Elektronendichte des oder der in einer Targetstruktur gebundenen Moleküls/e entspricht.

20

Der Beschuß des Kristalls mit Röntgenstrahlung kann bereits während des Auftropfens erfolgen oder nach Abschluß des Auftropfens. Bevorzugt ist insbesondere die Verwendung von „weißer Röntgenstrahlung“, also bspw. von Synchrotronstrahlung während des Auftropfens der Molekülspezies. Auf diese Weise kann die sukzessive Besetzung der Bindungsplätze für den oder die Liganden in der Targetstruktur im Kristall verfolgt werden. Besonders vorteilhaft ist es daher, wenn ein Verfahren zur Identifikation von ein kristallisiertes Protein bindenden Molekülen eingesetzt wird, bei dem (a) eine Molekülspezies nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24 auf den Kristall aufgebracht wird, (b) in einem zeitlichen Abstand von variabler Länge Beugungsintensitäten gemessen werden und (c) diese im zeitlichen Abstand gemessenen Beugungsintensitäten entsprechend ihrer zeitlichen Abfolge miteinander verglichen werden. Hierbei ist es besonders bevorzugt, wenn der Kristall in einer Orientierung während aller Beugungsaufnahmen verbleibt. Auf diesem Weg wird es erfin-

25

30

5      dungsgemäß möglich mit nur einem Kristall und einzelnen Röntgenaufnahmen (ohne einen vollständigen Datensatz aufnehmen zu müssen), die Komplexbildung nachzuweisen und damit die Testsubstanz als Liganden oder als nicht-bindend zu identifizieren. Mit zunehmender Komplexbildung nimmt nämlich die Korrelation zum völlig unbesetzten Ausgangszustand des Kristalls ab, weswegen (im zeitlichen Abstand wachsende) Intensitätsunterschiede des  
10      Reflexe die Komplexbildung indizieren. Ein derartiges Verfahren kann als Hochdurchsatzverfahren durchgeführt werden, da eine nichtbindende Substanz verworfen werden kann und mit einer anderen Substanz das Verfahren gemäß Schritten (a) bis (c) wiederholt werden kann. Innerhalb von wenigen Minuten kann erfindungsgemäß eine Testsubstanz als Ligand identifiziert oder als nichtbindend verworfen werden.

Erfindungsgemäß ist in einer besonderen Ausführungsform weiterhin ein Verfahren, wie zuvor beschrieben, Gegenstand der vorliegenden Patentanmeldung, bei dem die erfindungsgemäße Behandlung eines frei montierten Kristalls mit einer Vorrichtung zur Erzeugung von  
15      Mikrotropfen im Stapelbetrieb erfolgt, um mit einem hohen Durchsatz an zu komplexierenden Kristallen und deren röntgenkristallographischer Aufklärung arbeiten zu können. Hierzu wird/werden erfindungsgemäß zunächst (a) der Kristall bzw. die Kristalle, vorzugsweise frei montiert, vorgehalten. Diese Vorhaltung der Kristalle bis zum nächsten Verfahrensschritt (b) kann bspw. durch Lagerung der Kristalle in tiefgekühltem Zustand oder aber, stärker bevorzugt, in einem abgeschlossenen Gefäß (z.B. Vials) im Dampfgleichgewicht mit der Kristallisationsflüssigkeit erfolgen, um die Unversehrtheit des Kristalls bzw. der Kristalle bis zum Verfahrensschritt (b) sicherzustellen. Im Verfahrensschritt (b) werden auf die frei montierten Kristalle, wie erfindungsgemäß offenbart, Mikrotropfen einer bspw. einen Liganden enthaltenden Lösung aufgetragen, um den Kristall bspw. mit einem Liganden zu komplexieren.  
20      Nach der Komplexierung müssen die erfindungsgemäß behandelten Kristalle in einem Verfahrensschritt (c) gelagert werden, ehe in Verfahrensschritt (d) die röntgenkristallographische Untersuchung erfolgen kann. Die Lagerung in Verfahrensschritt (c) wird typischerweise in tiefgekühltem Zustand, vorzugsweise in flüssigem Stickstoff, erfolgen. Die Durchführung der Verfahrensschritte (a) bzw. (c) kann bspw. in Probenwechslern erfolgen, wie sie in der Cryokristallographie eingesetzt werden, sog. „Autosampler“ (z.B. vertrieben von Riken, Kouto, Japan oder X-Ray Research GmbH, Norderstedt, Deutschland). Hierbei werden die Proben  
30      auf einem Probenträger angeordnet und dieser horizontal verschoben, um im Stapelbetrieb

Proben durch eine Probenaufnahmeverrichtung aufnehmen zu können. Die Steuerung erfolgt automatisch. Gleichzeitig ist vorzugsweise eine Vorrichtung zur Tiefkühlung vorgesehen.

- 5 Ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Strukturbestimmung von kristallisierten Proteinen kann auch mit weiteren vor- oder nachgeschalteten Verfahrensschritten kombiniert werden. Insbesondere können nach Lokalisierung von mindestens einem Fragment als Ligand einer Targetstruktur, vorzugsweise von mindestens zwei an benachbarten Positionen in der Targetstruktur bindenden Fragmenten oder kleinen Molekülen, die Fragmente durch Konstruktion eines chemischen Linkers, der den Vorgaben der Targetstruktur entspricht, miteinander verbunden werden und ein Molekül chemisch synthetisiert werden, das die mindestens zwei durch das erfindungsgemäße Verfahren identifizierten Fragmente miteinander kovalent verknüpft. Ein derartiger aus Fragmenten kombinierter Ligand sollte zur Targetstruktur eine entsprechend erhöhte Bindungsaffinität aufweisen. Die Ausgestaltung eines Linkers kann bspw. über etablierte computerexperimentelle Methoden erfolgen, bspw. über LigBuilder (Journal of Molecular Modeling 2000, 6, 498) und spezielle Funktionen der vorgenannten Programme LUDI, SPROUT, GROW, PROLIGAND oder LEAPFROG. Die Bindung des mit Hilfe eines oder mehrerer Linker verknüpften Liganden kann dann wiederum röntgenkristallographisch untersucht und die Eignung des jeweiligen Linkers, der bspw. auch flexibel mit zahlreichen rotierbaren chemischen Bindungen versehen sein kann, zur Kombination der Fragmente überprüft werden. Sollte in einer bevorzugten Ausführungsform ein sehr flexibler Linker in einem ersten Ansatz eingesetzt worden sein, kann die im Kristall auftretende Struktur des Linkers ermittelt und in einem weiteren Ansatz die Flexibilität des Linkers nach Maßgabe der Positionierung des flexiblen Linkers in der Targetstruktur eingeschränkt werden, um derart die intrinsische Paßgenauigkeit des Liganden zu erhöhen.

- Bevorzugt kann vor der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eine Vorauswahl der in der auf den Kristall aufzubringenden Lösung enthaltenen Fragmente erfolgen. Auf diese Weise kann die Zahl der potentiell an die Zielstruktur bindenden Fragmente in der aufzubringenden Lösung erhöht werden. Eine Möglichkeit eine Vorauswahl zu treffen, besteht in der Vorschaltung eines computerexperimentellen Verfahrensschritts. Derart wird durch entsprechende Programme die erwünschte Bindungsregion auf der Zielstruktur analysiert und

gemäß den sterischen oder funktionellen Randbedingungen der die Bindungstasche bildenden Aminosäuren eine Vorhersage für einen geeigneten Liganden bzw. dessen Teilstruktur erhalten. Derartige Programme (bspw. LigBuilder, LEAPFROG, GROW, LUDI, SPROUT, PROLIGAND, s.o.) können eingesetzt werden, um zielgerichtet Fragmente für die nachfolgende Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens auszuwählen („in silico Docking“ Verfahren). Eine weitere Möglichkeit, vor der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens vermeintlich bindende Fragmente zu identifizieren, stellen in vitro Testsysteme dar. Hierbei kommen geeignete Testsysteme in Betracht, die auch bei nur schwach bindenden Fragmenten eine Unterscheidung zwischen nicht-bindenden und schwach bindenden Fragmenten erlauben. Bspw. kann ein derartiger in vitro Test mit Hilfe von Adsorptionssäulen durchgeführt werden. Die Zielstruktur wird auf der Adsorptionssäule gekoppelt und daran gebundene Fragmente isoliert und identifiziert. Ganz besonders bevorzugt können für in vitro Testversuche Bibliotheken von Fragmenten eingesetzt werden, bspw. auf der Basis von Naturstoffen, bspw. Peptidbibliotheken von bspw. Dipeptiden, ggf. als Peptidomimetika, bspw. als Gerüstpeptidomimetika. Schließlich können als in vitro „Screening“-Methoden zur Ermittlung einer Vorauswahl von Fragmenten auch biophysikalische Methoden zum Einsatz kommen, wie z.B. NMR-Spektroskopie oder Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (z.B. nach dem Verfahren von Biacore). Beide spektroskopischen Methoden können schwach bindende Fragmente identifizieren und eignen sich somit als Verfahrensschritt vor dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Identifikation von einem eine Zielstruktur bindenden Liganden, wobei (a) ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24 durchgeführt wird, (b) nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 29 die Struktur von mindestens einem Komplexes mit mindestens zwei Fragmenten ermittelt wird, (c) Linker zwischen den mindestens zwei Fragmenten zu einem Liganden ermittelt wird/werden und (d) ein Ligand, enthaltend die mindestens zwei Fragmente und den mindestens einen Linker, synthetisiert wird. Hierzu werden die vorgenannten verfahren eingesetzt, d.h. die Fragmente werden durch Linker, die bspw. auf Grund der Proteinstruktur ermittelt werden (bspw. durch das Programm LigBuilder), miteinander verbunden und entsprechende Verbindungen synthetisiert. Mit diesen aus den Fragmenten baukastenartig aufgebauten Verbindungen (Liganden), die eine sehr viel höhere Affinität zur Zielstruktur auf-

weisen als die einzelnen Fragmente, können dann wiederum Strukturuntersuchungen durchgeführt werden bzw. diese können in entsprechenden Assays auf ihre biologische Wirksamkeit hin untersucht werden.

- 5 Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch eine Vorrichtung zum Behandeln eines Kristalls mit einer Flüssigkeit (Lösung) mit einer Halterung zur Befestigung des Kristalls und einem Mikrodosiersystem möglich, das im Verhältnis zur Halterung so angeordnet ist, daß damit Mikro-Tropfen einer Flüssigkeit, die bspw. Lösungsmittel und mindestens einen Ligandentyp aufweist, auf den in der Halterung befestigten Kristall aufgebracht werden können.

10

Die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzte Vorrichtung kann in verschiedenen vorteilhaften Ausführungsformen vorliegen.

- 15 In einer vorteilhaften Ausführungsform der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneten Vorrichtung weist diese darüber hinaus ein Mittel auf, mit dem während des Auftropfens der Flüssigkeit um den Kristall herum eine definierte Umgebung erzeugt werden kann, ohne dass der Kristall jedoch in eine flüssige Umgebung eingetaucht werden müßte. In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneten Vorrichtung besteht das Erzeugen der definierten Um-
- 20 gebung darin, einen Gasstrom definierter Zusammensetzung um den Kristall herum zu erzeugen. In noch einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneten Vorrichtung ist die Halterung darüber hinaus so ausgebildet ist, daß durch die Halterung der Gasstrom so geführt werden kann, daß er auf den in der Halterung befestigten Kristall gerichtet ist. Dadurch kann der Kristall während der
- 25 Behandlung durch die Mikro-Tropfen in einer definierten Umgebung gehalten werden.

- Bei einer Vorrichtung zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens kann vorteilhafterweise die Halterung aus einem Trägerblock für eine Haltekapillare bestehen, die ein freies Auflageende für den Kristall besitzt. Schließlich kann daran anknüpfend die Haltekapil-
- 30 lare aus einer Mikropipette bestehen, in der sich ein Unterdruck erzeugen läßt, um den Kristall zu halten. Ferner kann bei einer vorteilhaften Ausführungsform der Trägerblock der Hal-

terung einen integralen Gaskanal mit einem Mündungsende enthalten, das auf das Auflageende der Haltekapillare gerichtet ist.

5 In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneten Vorrichtung kann diese darüber hinaus ein Gasmischmittel aufweisen, mit dem die Zusammensetzung des Gasstroms variabel eingestellt werden kann. Bei einer solchen vorteilhaften Ausführungsform kann das Gas aus Luft mit einem bestimmten Feuchtigkeitsgehalt bestehen und das Gasmischmittel so ausgebildet sein, daß damit die Luftfeuchtigkeit eingestellt werden kann. Auch kann eine solche Vorrichtung darüber hinaus ein  
10 Lösungsvermittler-beigabemittel umfassen, mit dem dem Gasstrom ein Lösungsvermittler für eine in die Kristallstruktur des Kristalls einzubringende Substanz beigemischt werden kann. Weitergebildet werden kann eine solche Vorrichtung dadurch, dass sie bevorzugt darüber hinaus ein Konzentrationseinstellmittel zur Einstellung der Konzentration des Lösungsvermittlers umfaßt.

15

Eine Vorrichtung zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens kann darüber hinaus ein Temperatureinstellmittel umfassen, mit dem die Temperatur des Gasstroms variabel eingestellt werden kann.

20 In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneten Vorrichtung ist deren Mikrodosiersystem so ausgebildet, daß es Mikro-Tropfen der auf den Kristall aufzubringenden Flüssigkeit erzeugen kann, die ein Volumen aufweisen, das kleiner als das Volumen des Kristalls ist. Bevorzugt ist hierbei, dass bei der Vorrichtung das Mikrodosiersystem so ausgebildet ist, daß es Mikro-Tropfen erzeugen  
25 kann, deren Volumen zwischen 10 und 20 Prozent des Kristallvolumens und vorzugsweise zwischen 5 und 10 Prozent des Kristallvolumens beträgt. Vorteilhafterweise ist bei einer solchen Vorrichtung das Mikrodosiersystem so ausgebildet, daß es Mikro-Tropfen erzeugen kann, deren Volumen zwischen 1 nl und 100 pl, vorzugsweise zwischen 100 pl und 20 pl und noch bevorzugt zwischen 20 pl und 4 pl liegt.

30

Um die Frequenz der Auftragung der Mikrotropfen auf den Kristall variieren zu können, kann zwischen der Vorrichtung zur Tropfenerzeugung und dem Kristall eine Lochplatte, die

bspw. mit einer gewissen Frequenz rotiert, angeordnet sein. Da – abhängig von der Vorrichtung zur Tropfenerzeugung – die Bereitstellung kleiner oder sehr kleiner Mikro(Piko)tropfen häufig eine höhere Tropfenfrequenz erforderlich macht, kann über die Zwischenschaltung einer Lochplatte, die nur jeden 2., 3. oder 4. oder weniger Tropfen auf den Kristall passieren lässt, auch das auf den Kristall aufgetragene Volumen gesteuert werden.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneten Vorrichtung weist das Mikrodosiersystem darüber hinaus ein Flüssigkeitszufuhrsystem auf, mit dem verschiedene Flüssigkeiten, die auf den Kristall aufgetropft werden sollen, in zeitlich gesteuerter Weise einem Tropfenerzeugungsteil des Mikrodosiersystems zugeführt werden können. Bei einer derartigen Vorrichtung umfaßt das Flüssigkeitszufuhrsystem des Mikrodosiersystems eine elektrisch ansteuerbare Präzisionsspritze und ein Leitungssystem, mit dem die Präzisionsspritze über elektrisch steuerbare Ventile mit verschiedenen Flüssigkeitsvorratsbehältern und mit dem Tropfenerzeugungsteil des Mikrodosiersystems verbunden werden kann, um dieser Flüssigkeit für die Tropfenerzeugung zuzuführen.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneten Vorrichtung ist das Mikrodosiersystem so ausgebildet, daß es eine Piezopipette umfaßt, die das Tropfenerzeugungsteil bildet. Vorteilhaft ist es hierbei, wenn bei einer solchen Vorrichtung die Piezopipette aus einer Kapillare besteht, die von einem piezoelektrischen Element umschlossen ist. Schließlich kann bei einer solchen Vorrichtung das Mikrodosiersystem darüber hinaus ein mit der Piezopipette elektrisch verbundenes Steuergerät umfassen, das so ausgebildet ist, daß damit unterschiedlich geformte Spannungspulse an die Piezopipette angelegt werden können, deren Formen die Form und Größe der Mikro-Tropfen und deren Frequenz die Frequenz der Mikro-Tropfen steuern.

Vorteilhaft ist eine Vorrichtung zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens auch dann, wenn bei dieser das Mikrodosiersystem eine Kapillare und ein in der Kapillare angeordnetes Mikroventil umfaßt. Schließlich kann das Mikrodosiersystem einer solchen Vorrichtung darüber hinaus ein Steuergerät zum Ein- und Ausschalten des Mikroventils umfassen, um die Mikro-Tropfen zu erzeugen.

Verwendet wird eine Vorrichtung zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens besonders bevorzugt dann, wenn sie mehrere Mikrodosiersysteme umfaßt, die im Verhältnis zur Halterung so angeordnet sind, daß damit Mikro-Tropfen verschiedener Flüssigkeiten auf  
5 den in der Halterung befestigten Kristall aufgebracht werden können. Schließlich sollte bei einer solchen Vorrichtung die Halterung darüber hinaus so ausgebildet sein, daß sie zur Befestigung eines Proteinkristalls geeignet ist.

Bevorzugt besteht bei einer Vorrichtung die verwendete Flüssigkeit aus einer Lösung, wie  
10 vorstehend bei den bevorzugten Ausführungsformen eines erfindungsgemäßen Verfahrens offenbart.

Bevorzugt sind weiterhin Vorrichtungen, bei denen in der Lösung eine Substanz oder mehrere Substanzen gelöst ist bzw. sind, die in die Struktur des Kristalls eingebracht werden soll  
15 bzw. sollen oder mit dieser reagieren soll bzw. sollen. Bei derartigen Vorrichtungen kann/können die Substanz bzw. die Substanzen aus einem oder mehreren Liganden oder Inhibitoren bestehen.

Es ist ferner besonders vorteilhaft, daß die erfindungsgemäße Vorrichtung auch auf einem  
20 Goniometerkopf im Röntgenstrahl oder in einem Synchrotron befestigt werden kann, so daß der zeitliche Ablauf der Veränderung der kristallisierten Proteinstruktur, z.B. infolge der Ligandenbindung während des Auftropfens der Mikro-Tropfen, im Meßgerät beobachtet werden kann. Damit kann ein Goniometerkopf eine Vorrichtung, wie vorstehen offenbart, zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens aufweisen. Ein solcher Goniometerkopf  
25 mit einer derartigen Vorrichtung kann wiederum Bestandteil einer Röntgenbestrahlungsanlage oder einer Synchrotronbestrahlungsanlage sein.

Damit werden vorliegendenfalls die vorbeschriebenen Ausführungsformen einer Vorrichtung zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens, wie es in dieser Anmeldung sich mit  
30 seinen bevorzugten Ausgestaltungsformen offenbart findet, ebenfalls offenbart.



Besonders bevorzugte Ausführungsformen der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneten Vorrichtung werden nachfolgend anhand der Figuren näher erläutert. Es zeigen

- 5 Fig. 1 eine teilweise im Schnitt dargestellte Ansicht einer Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zum Behandeln eines Kristalls mit einer Lösung,

Fig. 2 ein Gehäuse eines Steuergeräts zur Steuerung eines bei einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung verwendeten Mikrodosiersystems,

10

Fig. 3 zeigt ein Flüssigkeitszufuhrsystem für ein Mikrodosiersystem, das bei einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung verwendet werden kann.

- Die Erfindung wird im folgenden am Beispiel der Behandlung von Proteinkristallen beschrieben, sie kann aber auch in analoger Weise bei der Behandlung von anderen Kristallen eingesetzt werden.
- 15

Fig. 1 zeigt eine erste Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zum Behandeln eines Kristalls. Dabei ist links in der Fig. 1 eine Halterung 1 dargestellt, die dazu dient, einen Proteinkristall 2 zu befestigen. Die in der Fig. 1 dargestellte Halterung, die in ihrer generischen Art auch als „free mounting system“ bezeichnet wird, ist bereits aus dem Stand der Technik bekannt und z.B. in der Deutschen Patentschrift DE 198 42 797 C1 beschrieben worden. Diese Druckschrift wird insoweit vollumfänglich in die Offenbarung der vorliegenden Anmeldung einbezogen.

20

25

Die Halterung 1, die in der Fig. 1 in einer Schnittansicht von der Seite dargestellt ist, besteht im wesentlichen aus einem Trägerblock 3, der ein einschiebbares Einsatzteil 4 aufweist, das in eine Öffnung des Trägerblocks 3 eingeschoben werden kann. Am Einsatzteil ist eine Haltekapillare 5 angebracht, an deren freiem Auflageende der Proteinkristall 2 gehalten wird. Die Haltekapillare besteht vorzugsweise aus einer Mikropipette, in der über eine in der Fig. 1 nicht dargestellte und mit dem anderen Ende der Mikropipette verbundene Pumpvorrichtung ein Unterdruck erzeugt wird, der dazu dient, den Proteinkristall 2 an dem freien Auflageende

30

zu halten. Das linke Ende 8 des Einsatzteils ist so ausgebildet, daß daran die Halterung 1 an einem Goniometerkopf einer Röntgen- oder Synchrotronbestrahlungsanlage befestigt werden kann.

- 5 In einer Röntgen- oder Synchrotronbestrahlungsanlage kann die Beugung von Röntgenstrahlen beim Durchgang durch das Kristallgitter des Proteinkristalls ausgenutzt werden, um aus dem Beugungsbild auf die räumliche Anordnung der Atome und Moleküle in dem kristallisierten Protein zu schließen bzw. die Struktur durch mathematische Operationen zu errechnen. Die erforderlichen Röntgenstrahlen können z.B. durch Beschuß von Kupfer oder anderen Materialien mit Elektronen erzeugt werden (bspw. CuK $\alpha$ -Strahlung). Alternativ kann die Röntgenstrahlung auch in einem Synchrotron, d.h. einem Teilchenbeschleuniger, erzeugt werden, bei dem die Röntgenstrahlung von auf Kreisbahnen beschleunigten Elektronen emittiert wird. Das Synchrotron besitzt trotz des größeren apparativen Aufwands eine Reihe von Vorteilen gegenüber der herkömmlichen Erzeugung von Röntgenstrahlung durch Elektronenbeschuß von Metallen. So besitzen die durch Synchrotrone erzeugten Röntgenstrahlen eine höhere Intensität und können in verschiedenen Wellenlängen gewählt werden. Auch besteht auf diese Weise die Möglichkeit, „weißes“ Röntgenlicht einzusetzen und damit den Kristall mit Röntgenblitzen, die Röntgenstrahlen aller Wellenlängen aufweisen, zu beschießen. Darüber hinaus lassen sich die Messungen mit dem Synchrotron wesentlich schneller als mit
- 10  
15  
20 herkömmlichen Röntgenbestrahlungsanlagen durchführen.

- In die Halterung 1 ist ferner ein Gaskanal 6 integriert, dessen Mündungsende 7 auf das freie Auflageende der Haltekapillare 5 gerichtet ist, an dem der Proteinkristall 2 befestigt ist. Dabei wird der am Auflageende angebrachte Proteinkristall 2 vollständig vom Gasstrom aus dem Gaskanal 6 umschlossen, so daß eine definierte Gasatmosphäre um den Proteinkristall herum erzeugt werden kann. Der Gaskanal 6 ist an seinem in der Fig. 1 als offen dargestellten Ende mit einem Gaserzeugungsmittel und einem Gasmischmittel verbunden, mit dem die Zusammensetzung des Gasstroms variabel eingestellt werden kann. Falls das um den Proteinkristall herum befindliche Gas Luft ist, kann das Gasmischmittel z.B. dazu dienen, die Luftfeuchtigkeit auf einen vorherbestimmten optimalen Wert einzuregeln. Es kann darüber hinaus auch ein Temperatureinstellmittel vorgesehen sein, mit dem die Temperatur des Gasstroms gemessen und auf einen bestimmten vorgebbaren Wert eingeregelt werden kann. Auch können an-
- 25  
30

dere gasförmige Substanzen dem Gasstrom beigemischt werden, so dass bspw. der Stickstoff- oder Sauerstoffgehalt der Luft modifiziert, bspw. erhöht, werden kann.

5 In der Deutschen Patentanmeldung Nr. 10232172.8-52 mit dem Titel „Vorrichtung und Verfahren zur Erzeugung einer definierten Umgebung für partikelförmige Proben“ ist bereits eine Vorrichtung und ein Verfahren beschrieben, mit dem sich eine hochgenaue und langzeit-  
10 stabile Feuchteinstellung eines durch die oben beschriebene Halterung geführten feuchten Gasstroms am Ort des partikelförmigen Kristalls erreichen läßt. Diese Druckschrift wird daher insoweit ebenfalls vollumfänglich in die Offenbarung der vorliegenden Anmeldung einbezogen.

Über dem Kristall ist ein Mikroskop mit Videosystem 10 angebracht, mit dem der Proteinkristall während der Behandlung mit der Substanz beobachtet werden kann. Ggf. kann infolge der Beobachtung über das Videosystem der Behandlungsmodus modifiziert oder auch die  
15 Behandlung eingestellt werden.

Die in der Fig. 1 dargestellte erfindungsgemäße Vorrichtung zum Behandeln eines Kristalls mit einer Substanz umfaßt darüber hinaus ein Mikrodosiersystem 11, das rechts in der Fig. 1 in einer Seitenansicht im Schnitt dargestellt ist.

20 Das Mikrodosiersystem 11 umfaßt eine sogenannte Piezopipette 12, die in einem Stativ 15 gehalten wird und so auf den Proteinkristall 2 ausgerichtet ist, daß dieser mittels der Piezopipette mit Tropfen beschossen werden kann. Die Piezopipette ist in der Fig. 1 aus Gründen der Anschaulichkeit in einem vergrößerten Maßstab im Verhältnis zur Halterung 1 dargestellt.  
25 Die Piezopipette ist so angeordnet, daß die Spitze der Piezopipette einen Abstand von typischerweise 3 mm zu dem Proteinkristall aufweist. Vorzugsweise liegt dieser Abstand in einem Bereich von 1 – 5 mm, kann jedoch unter besonderen Umständen auch größer oder kleiner gewählt werden.

30 Die Piezopipette 12 besteht aus einer Glaskapillare 13, die z.B. aus Borosilicatglas bestehen kann. Die Durchmesser der Öffnung der Glaskapillare ist einer der Faktoren, die die Größe der von der Piezopipette abgegebenen Mikro-Tropfen beeinflussen und kann z.B. in einem

Bereich zwischen 5 und 50 Mikrometer liegen. Die Glaskapillare 13 ist von einem piezoelektrischen Element 14 umschlossen, das aus einem Material besteht, das einen piezoelektrischen Effekt zeigt. Es kann sich bei diesem Material z.B. um einen Piezokristall handeln. Das piezoelektrische Element 14 ist darüber hinaus über zwei Kabel 16 mit einem Steuergerät 17 elektrisch verbunden, mit dem eine Spannung an das piezoelektrische Element 14 angelegt werden kann. Wird ein Spannungspuls durch das Steuergerät 17 an das piezoelektrische Element 14 angelegt, so wird das piezoelektrische Element 14 und mit diesem auch die Glaskapillare 13 kontrahiert und ein Tropfen aus der Öffnung der Piezopipette herausgeschossen. Über das Steuergerät 17 können unterschiedlich geformte Spannungspulse an die Piezopipette angelegt werden können, deren Formen die Form und Größe der Mikro-Tropfen und deren Frequenz die Frequenz der Mikro-Tropfen beeinflussen.

In der Fig. 2 ist ein Gehäuse eines möglichen Steuergeräts zur Steuerung der Piezopipette dargestellt, wobei die einzelnen Steuerungsmöglichkeiten anhand der in der Fig. 2 dargestellten Schalter und Steuerelemente des Steuergeräts erläutert werden sollen. Das Steuergerät weist zunächst drei verschiedene LCD-Anzeigen 20, 21 und 22 auf. Auf der ersten LCD-Anzeige 20 wird der aktuelle Wert für den Spannungspegel der Impulsausgangsspannung für das Piezopipettensteuersignal angezeigt. Dieser Wert läßt sich über einen Drehregler 23 variabel einstellen. Auch die Impulsweite des Pipettenansteuersignals, die auf der zweiten LCD-Anzeige 21 in Mikrosekunden angezeigt wird, läßt sich mittels eines zweiten Drehreglers 24 einstellen. Schließlich ist ein dritter Drehregler 25 vorgesehen, um die Frequenz der an die Piezopipette angelegten Spannungsimpulse einzustellen, die auf der dritten LCD-Anzeige 22 angezeigt wird. Diese Frequenz, die bis zu einige kHz betragen kann (z.B. 2 kHz) entspricht der Frequenz, mit der die Mikro-Tropfen aus der Piezopipette auf den Kristall geschleudert werden. Der Einstellbereich der Frequenz kann z.B. in einem Bereich zwischen 1 Hz und 6 kHz liegen. Die Höhe der Impulsausgangsspannung und die Weite der Spannungsimpulse müssen zunächst so eingestellt werden, daß es überhaupt zu einer Tropfenerzeugung mit der Piezopipette kommt. Darauf wird die Frequenz gewählt, die für den jeweiligen Kristallbehandlungsprozeß ideal ist. Die Frequenz kann natürlich auch während des Kristallbehandlungsprozesses laufend variiert werden.

Das Steuergerät weist ferner zwei Eingänge 26 auf, an denen die beiden Verbindungskabel der Piezopipette angeschlossen werden. Ferner sind ein Netzkabel 27 sowie ein Netzanschluß 28 zur Stromversorgung des Steuergeräts vorgesehen. Über den weiteren Signaleingang 29 können von anderen elektrischen Geräten vorgegebene Spannungsimpulsfolgen angelegt werden, um die Mikro-Tropfenerzeugung auszulösen und die Mikro-Tropfenfolge und -form von außen zu steuern. Das kann z.B. sinnvoll sein, wenn es ein zentrales Steuergerät gibt, das sowohl die Tropfenerzeugung als auch andere Parameter der Kristallbehandlung wie den über die Kristallhalterung zugeführten Gasstrom, die Zusammensetzung des Gasstroms (z.B. seinen Feuchtegehalt), die Temperatur des Gasstroms, eine angeschlossene Röntgenbestrahlungsanlage etc. steuert und die verschiedenen Steuerungsparameter in einer vorherbestimmten Weise zueinander synchronisiert.

Der Schalter 30 ist dazu vorgesehen, den Piezopipettenbetrieb ein- und auszuschalten. Über den weiteren Schalter 31 kann zwischen Einzelspannungsimpulsbetrieb und kontinuierlichem Spannungsimpulsbetrieb umgeschaltet werden, d.h. zwischen Einzeltropfenerzeugung und kontinuierlicher Tropfenerzeugung. Für die Einzeltropfenerzeugung kann ferner ein Taster 32 vorgesehen sein, über den einzelne Spannungsimpulse an die Piezopipette angelegt werden können, wenn es gewünscht ist, einzelne Tropfen per Handbetrieb auf den Kristall zu schießen.

20

Der Schalter 33 dient schließlich dazu zwischen verschiedenen Impulsformen der an die Piezopipette 12 angelegten Spannungsimpulse variieren zu können. In der Schalterstellung A kann z.B. ein vorgegebener Standard-Rechteckspannungsimpuls mit vorherbestimmter Dauer und Höhe erzeugt werden, während in der Schalterstellung B ein Rechteckspannungsimpuls erzeugt werden kann, dessen Dauer und Höhe variabel eingestellt werden kann. Es ist natürlich bei anderen Ausführungen auch denkbar, daß Spannungsimpulse angelegt werden, die von der Rechteckform abweichen. Die Impulsform der Spannungsimpulse wird nun so gewählt, daß eine optimale Tropfenerzeugung in Hinblick auf den zu behandelnden Kristall gewährleistet ist.

30

Verschiedene Größen der Mikro-Tropfen, die z.B. für verschiedene Kristallgrößen geeignet sein können, können über die Variation der Spannungspulsweiten und Spannungspulshöhen eingestellt werden, die an die Piezopipette angelegten Spannungen aufweisen.

- 5 Die Glaskapillare 13 der Piezopipette 12 ist typischerweise über eine Zuleitung 18 mit einem in der Figur 1 nicht dargestellten Vorratsgefäß verbunden, das die Lösung enthält, die auf den Proteinkristall getropft werden soll. Diese Lösung enthält die Substanz oder die Substanzen, mit der bzw. denen der Proteinkristall behandelt werden soll. Die Oberkante des Flüssigkeitsspiegels der sich im Vorratsgefäß befindenden Flüssigkeit sollte dabei etwas höher als die
- 10 Unterkante der Pipettendüse eingestellt werden. Alternativ dazu kann die Flüssigkeit bei einer Ausführungsform ohne Vorratsgefäß aber auch direkt über die Auslaßöffnung der Piezopipette in die Piezopipette gesaugt werden, um sie dann später wieder abgeben zu können. Es kann auch eine Temperiertvorrichtung um das Vorratsgefäß herum angeordnet sein, um die in dem Vorratsgefäß sich befindende Flüssigkeit auf eine gewünschte Temperatur zu bringen.
- 15 Gemäß einer Ausführungsform kann vor dem Aufbringen der Lösung auf den Kristall der pH-Wert und/oder die Ionenstärke (bzw. spezifische Salzkonzentrationen) der Lösung gemäß den im Stand der Technik bekannten Verfahren auf einen gewünschten Wert eingestellt werden.
- 20 Unter Mikro-Tropfen im Sinne der vorliegenden Erfindung sollen Tropfen zu verstehen sein, deren Volumen kleiner als 1 nl ist, wobei das Volumen der Mikro-Tropfen vorzugsweise zwischen 1 nl (nanoliter) und 1 pl (picoliter), noch weiter bevorzugt zwischen 100 pl und 20 pl und noch stärker bevorzugt zwischen 20 pl und 4 pl liegt. Aus diesen Größen lassen sich über die Volumensformel die entsprechenden geeigneten Durchmesser der Tropfen errechnen,
- 25 wenn man näherungsweise davon ausgeht, daß die Tropfen kugelförmig sind. Die gewünschte Tropfengröße kann erfindungsgemäß eingestellt werden.

Die Mikro-Tropfen der auf den Kristall aufzubringenden Flüssigkeit sind dabei vorzugsweise kleiner als das Volumen des Kristalls ist. Ein typisches Kristallvolumen kann dabei z.B. in

30 einer Größenordnung von 1 nl liegen.

Das Volumen der im speziellen Fall verwendeten Mikro-Tropfen wird in Abhängigkeit vom Volumen des Kristalls gewählt. Dabei betragen die Volumen der Mikrotropfen weniger als 50 %, z.B. 1 bis 20 %, des Kristallvolumens und vorzugsweise von 1, stärker bevorzugt von 5 bis 10 % des Kristallvolumens.

5

Die Tropfenerzeugung mittels einer Piezopipette ist nur ein Beispiel für eine Mikrodosiervorrichtung. Es können auch andere Vorrichtungen verwendet werden, die in der Lage sind, Mikro-Tropfen zu erzeugen.

- 10 So kann z.B. auch ein Mikrodosiersystem verwendet werden, das eine Kapillare und ein in der Kapillare angeordnetes Mikroventil umfaßt. Dabei wird die Flüssigkeit unter Druck aus einem Vorratsgefäß auf das Mikroventil gepreßt, das von einem Steuergerät elektrisch innerhalb eines kurzen Zeitintervalls geöffnet und danach wieder geschlossen wird, um die Tropfen zu erzeugen. Die Begrenzung der Tropfengröße ergibt sich hier durch die noch steuerbare Öff-
- 15 nungsdauer des Ventils.

- Als Mikrodosiersystem kann bei einer anderen Ausführungsform auch ein Zerstäuber dienen. Ein Zerstäuber hat allerdings gegenüber den oben beschriebenen Lösungen den Nachteil, daß das Ausrichten der Tropfen auf den Kristall schwieriger ist. Daher wird vorteilhafter Weise
- 20 dem Zerstäuber ein Mittel nachgeordnet, das die Orientierung der aus dem Zerstäuber erhaltenen Mikro-Tropfen auf den Kristall sicherstellt.

- Es ist gemäß einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung auch denkbar, daß die Mikrodosier-Vorrichtung aus einem „Loop“, bspw. einer Schlaufe, besteht,
- 25 mit dem einzelne Tropfen (oder nur ein Tropfen) auf den Kristall durch bspw. Abschütteln oder Abtropfenlassen von dem „Loop“ aufgebracht werden. Es muß allerdings bei dieser Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe sichergestellt sein, daß die aufgebrachten Tropfenvolumina klein genug für die Proteinkristalle (im Sinn der voranstehend offenbarten Volumenverhältnisse von Kristall zu Tropfen) sind.

30

Auch alle weiteren technischen Möglichkeiten, Mikro-Tropfen entsprechender Größe zu erzeugen, sind Lösungen im Sinne der vorliegenden Erfindung.

Bei einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Proteinkristall zunächst an dem freien Auflagenende der Haltekapillare 2 befestigt. Anstelle der Haltekapillare 2 kann auch ein sogenannter „Loop“, also eine Art Schlaufe, verwendet werden, in dem der Proteinkristall befestigt ist. Der Proteinkristall ist dabei frei von jeglicher Oberflächenlösung und damit zugänglich für Lösungen, die von außen direkt mittels des Mikrodosiersystems aufgebracht werden können. Durch die Halterung 1 wird nun typischerweise eine Gasatmosphäre um den Proteinkristall 2 herum erzeugt, indem ein Gasstrom definierter Zusammensetzung und Temperatur durch den Gaskanal 6 der Halterung 1 geführt wird. Bei dem beschriebenen Verfahren wird es sich typischerweise um einen Luftstrom, ggf. unter Beimischung anderer gasförmiger Substanzen, mit einem geregelten Feuchtigkeitsgehalt (d.h. Wassergehalt) und einer geregelten Temperatur handeln.

In die Kristallstruktur des Proteinkristalls soll nun ein Inhibitor eingebracht werden, der Bestandteil einer Substanz ist, die der Lösung zugesetzt wurde, die sich in dem Vorratsgefäß befindet, das mit der Piezopipette verbunden ist. Es hat sich durch Experimente gezeigt, daß lokal auf die Oberfläche des Kristalls aufgetragene Lösungen (wie bspw. DMSO) mit hoher Inhibitor-Konzentration den Kristall in der Regel nicht schädigen. Nun werden durch das Steuergerät 17 elektrische Spannungspulse an die Piezopipette 12 angelegt und Mikro-Tropfen mit der Inhibitor-Lösung auf den Proteinkristall 2 geschleudert. Durch das Aufspritzen einzelner Mikro-Tropfen bleibt der den Proteinkristall umströmende Gasstrom praktisch unbeeinflusst, so daß der Proteinkristall in seiner stabilen definierten Umgebung verbleibt. Die Erhaltung einer stabilen Umgebung ist insbesondere für die relativ instabilen Proteinkristalle, die durch geringe Gitterkräfte zusammengehalten werden, wichtig, damit die Kristalle nicht zerstört werden, bevor sie z.B. einer röntgenkristallographischen Untersuchung unterzogen werden. Die Feuchtigkeit des den Kristall umgebenden Luftstroms kann nun im Zusammenspiel mit der Größe und Frequenz der über die Mikrodosiervorrichtung auf den Proteinkristall aufgetragenen Tropfen so eingestellt werden, daß der Kristall möglichst sein Volumen nur wenig ändert, indem ein Gleichgewicht zwischen Abdampfen von Flüssigkeit vom Kristall und Zuwachs an Flüssigkeit durch Auftropfen von Flüssigkeit mittels der Mikrodosiervorrichtung erreicht wird. Dadurch wird der Kristall nur minimal belastet und es kann ein schonendes Einbringen des/der Liganden über die lokal aufgetragenen Mikrotropfen erreicht wer-



werden. Dieser Vorgang der Einstellung der optimalen Luftfeuchtigkeit bzw. der optimalen Auftropffrequenz durch die Mikrodosiervorrichtung kann über ein Regelement automatisch geregelt werden, daß entsprechende Änderungen der Feuchtigkeit des Luftstroms und/oder der Auftropffrequenz vornimmt, wenn sich das gemessene Volumen des Kristalls ändert.

5

Während des Kristallbehandlungsprozesses kann der Kristall gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung auch mit gepulstem Licht bestrahlt werden, z.B. über ein Stroboskop, um mittels des Videosystems in regelmäßigen Abständen eine Vermessung des Volumens des Tropfens durchführen zu können.

10

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist es auch denkbar, daß der Kristall, der sich in dem Gasstrom definierter Zusammensetzung befindet, von einer Lösung umgeben ist, so daß die durch die Mikrodosiervorrichtung aufgetragenen Tropfen nicht direkt auf den Kristall, sondern in die den Kristall umgebende Lösung gegeben werden.

15

Die erfindungsgemäße Vorrichtung bzw. das erfindungsgemäße Verfahren erweisen sich auch dann besonders vorteilhaft, wenn Liganden, bspw. Inhibitoren oder andere Stoffe, in einen Kristall eingebracht werden sollen, die selbst in einer wäßrigen Lösung nur schwer zu lösen sind. Tatsächlich erweist sich eine Reihe von Liganden als in wäßrigen Systemen ausgesprochen schwer löslich, so daß mit dem in der Beschreibungseinleitung beschriebenen klassischen „Soaking“-Verfahren diese Liganden/Inhibitoren nicht in den Kristall eingebracht werden können, da die Konzentration der Liganden/Inhibitoren in der wäßrigen Lösung zu gering ist. Wird nun mittels des Mikrodosiersystems eine wäßrige Lösung, in der diese Liganden und/oder Inhibitoren gelöst sind, auf den Kristall aufgetropft, so verdunstet das Wasser nach jedem Auftropfen vollständig, während der Ligand auf bzw. im Kristall verbleibt. Durch wiederholte Auftropfzyklen können so größere Mengen des (schwer löslichen) Liganden auf den Kristall aufgebracht werden. Der Ligand akkumuliert sich so allmählich auf bzw. im Kristall, bis eine ausreichende Menge des Liganden in den Kristall eingebracht ist und eine zufriedenstellende Ligand-Protein-Komplexbildung (also die Besetzung des Kristalls an den Bindungsstellen der kristallisierten Proteine ausreichend ist, eine Elektronendichte für den Liganden zu bestimmen) erreicht ist.

20

25

30

Der Vorteil bei diesem Verfahren liegt auch darin, daß die Proteinkristalle nicht mit einem weiteren Lösungsmittel versetzt werden müssen und so die Behandlung der empfindlichen Kristalle schonender wird. Außerdem besteht derart nicht die Gefahr, daß der Ligand aufgrund seiner geringen Löslichkeit auf dem Kristall bzw. in den Lösungsmittelkanälen präzipitiert. Bei diesem Verfahren kann die Menge an durch das Mikrodosiersystem aufzutropfender Lösung durch die Konzentration der Lösung sowie einer Abschätzung der Molarität des Proteins im Kristall berechnet werden. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß man mit Wasser als dem einzigen Lösungsmittel für den Liganden im Vergleich zu anderen Lösungsmitteln oder Flüssigkeiten besonders kleine Tropfengrößen erzielen kann, was insbesondere bei kleinen Proteinkristallen wichtig ist, da erfindungsgemäß die Tropfengröße kleiner als die Größe des Kristalls sein sollte.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zum Behandeln eines Kristalls mit einem Substrat kann auch in eine Röntgenbestrahlungsanlage oder Synchrotronbestrahlungsanlage integriert sein, so daß es möglich wird, während der Behandlung des Proteinkristalls mit der Substanz Beugungsbilder des Kristalls aufzunehmen und so den Behandlungsprozeß, d.h. die sukzessive Besetzung der Bindungsstellen des Kristalls, „online“ zu beobachten. Hierzu kann die Halterung 1 z.B. an einem Goniometer einer Röntgen- oder Synchrotron-Bestrahlungsanlage befestigt werden. Der Proteinkristall kann vor der röntgenkristallographischen Untersuchung auch eingefroren werden, was in der Regel unter Verwendung von flüssigem Stickstoff erfolgt (sogenannte Cryo-Kristallographie). Hierdurch werden bei röntgenkristallographischen Untersuchungen die Intensitäten der Reflexe des Beugungsbildes ermittelt und schließlich unter Verwendung der Phaseninformation, z.B. aus isomorpher Ersetzung oder MAD („multiple anomalous scattering“), die Elektronendichte der Struktur ermittelt werden.

Selbstverständlich können auch andere physikalische, insbesondere spektroskopische, Messungen mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung an dem Kristall durchgeführt werden. So kann die erfindungsgemäße Vorrichtung z.B. auch mit einer Anlage zur Aufnahme einer Absorptionsspektrums kombiniert werden, um das Absorptionsspektrum des Kristalls aufzunehmen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann auch oder nur dem durch die Halterung 1 geführten Gasstrom ein Lösungsvermittler beigelegt werden, der sich für die in den Proteinkristall einzubringende Substanz eignet, also z.B. ein Lösungsvermittler für einen schwerlöslichen Liganden. Hierzu kann zusätzlich ein Verdampfer vorgesehen sein, um den Lösungsvermittler vor der Einleitung in den Gaskanal 9 der Halterung 1 zu verdampfen. Auch kann eine Vorrichtung vorgesehen sein, die dazu dient, die Konzentration des Lösungsvermittlers im Gasstrom variabel einzustellen und den erforderlichen Bedingungen anzupassen. So läßt sich eine im Gegensatz zum klassischen „Soaking“-Prozeß sehr schonende Zufuhr von Lösungsvermittler zu dem Proteinkristall erreichen. Während der Zufuhr des den Lösungsvermittler enthaltenden Gasstroms kann dann über die Piezopipette die Ligandenlösung auf den Proteinkristall in Mikro-Tropfenform aufgebracht werden. Insgesamt ergibt sich also erfindungsgemäß die Möglichkeit nur der als Mikrotropfen aufzubringenden Ligandenlösung Lösungsvermittler oder nur dem zugeführten Gasstrom beizumischen. Ggf. können beide Alternativen auch kombiniert werden, so dass sowohl im Mikrotropfen als auch im Gasstrom der Lösungsmittelvermittler (gleich oder verschieden) zugesetzt werden.

Auch kann die über die Mikro-Tropfen mittels des Mikrodosiersystems aufgebrachte Lösung mehrere verschiedene Substanzen enthalten, mit denen der Kristall behandelt werden soll. Es kann sich dabei zum Beispiel um mehrere Liganden, bspw. um mehrere Substrate oder um ein Substrat und um einen katalytisch wirkenden Liganden, handeln, die in einer Lösung gelöst sind, die mittels einer Piezopipette auf den Kristall aufgebracht werden soll.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann die Piezopipette auch mit einem speziellen Flüssigkeitszufuhrsystem versehen sein, mit dem es möglich ist, die Zufuhr verschiedener Flüssigkeiten in die Piezopipette zeitlich in gewünschter Weise zu steuern. In der Fig. 3 ist ein solches Flüssigkeitszufuhrsystem dargestellt. Das in der Fig. 3 dargestellte Flüssigkeitszufuhrsystem umfaßt eine Präzisionsspritze 40, die aus einem Zylinder 41 besteht, in dem ein über einen (in der Fig. 3 nicht dargestellten) Motor angetriebener Kolben 42 hin- und herlaufen kann. Wenn der Kolben nach unten läuft, können verschiedene Flüssigkeiten aus den Flüssigkeitsbehältern 43, 44, 45 oder 46 in den Zylinder gesaugt werden, wenn eines der entsprechenden elektrisch ansteuerbaren Ventile 47, 48, 49 bzw. 50 geöffnet wird und zusätzlich das vor dem Zylinder liegende elektrisch steuerbare Ventil 51 geöffnet wird. Wird das Ventil 51

dann wieder geschlossen, das am Auslaß des Zylinders liegende elektrisch steuerbare Ventil 52 geöffnet und der Kolben 42 nach oben getrieben, so kann die angesaugte Flüssigkeit über die zur Piezopipette führende Flüssigkeitszufuhrleitung 53 zur Piezopipette geführt werden, um dann schließlich in Tropfenform auf den Kristall gegeben werden zu können.

5

Die Behälter 45 und 46 können z.B. zwei verschiedene Lösungen mit verschiedenen Liganden enthalten, die mit dem Protein des zu betreffenden Kristall einen Komplex bilden sollen. Die Behandlung des Kristalls kann dabei z.B. so erfolgen, daß zunächst die Lösung 1 aus dem Behälter 45 und danach die Lösung 2 aus dem Behälter 46 auf den Kristall aufgetropft wird. Zwischen den beiden Lösungen kann eine Reinigungslösung durch die Leitungen gespült werden, die sich in dem Behälter 44 befindet. Der weitere Behälter 47 dient als Abfallbehälter, um Flüssigkeitsmengen aufzunehmen, die nicht mehr benötigt werden und aus dem Zufuhrsystem entfernt werden müssen. Durch geeignete zeitliche Ansteuerung der Ventile 47 – 52 und des Kolbens 42 können nun der Piezopipette die gewünschten Lösungen in der gewünschten Menge zugeführt werden.

15

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können auch mehrere Mikrodosiersysteme, z.B. mehrere Piezopipetten, verwendet werden, mit denen jeweils unterschiedliche oder auch identische Substanzen (bspw. an zwei verschiedenen, lokal abgegrenzten Bereichen des Kristalls) auf den Kristall aufgebracht werden. Eine solche Anordnung kann z.B. von Vorteil sein, wenn zwei verschiedene Liganden in eine Proteinkristallstruktur eingebracht werden sollen. Die Liganden werden dann in verschiedenen Lösungen gelöst, die in die beiden Flüssigkeitsvorratsbehälter zweier Piezopipetten gegeben werden. Über die beiden Piezopipetten werden dann die beiden Lösungen mit den verschiedenen Liganden in Mikro-Tropfenform auf den Proteinkristall aufgebracht. Dabei können über das mit einer Piezopipette jeweils verbundene Steuergerät, das die Tropfenerzeugung steuert, unterschiedliche Spannungsimpulse und Spannungspulsfolgen an die Piezopipetten angelegt werden, um so eine optimale Form und Frequenz der Mikro-Tropfen zu erreichen, die für den jeweiligen Liganden ideal ist.

25

30

Die Verwendung von zwei Mikrodosiersystemen, mit denen getrennt zwei verschiedene Substanzen aufgebracht werden, die erst auf dem Kristall zusammentreffen, ist insbesondere auch

dann vorteilhaft, wenn das kristallisierte Protein Katalysatorfunktion für die beiden Substanzen, die beide als Reaktanden im kristallisierten Protein gebunden werden, hat. Erfolgt das Aufspritzen der beiden Reaktanden separat durch zwei Mikrodosiersysteme während der Röntgenbestrahlung des Proteinkristalls, kann die Reaktion der Reaktanden unter katalytischem Einsatz der kristallisierten Proteine verfolgt werden. Eine Voraussetzung für eine derartige röntgenkristallographische Untersuchung ist natürlich die Stabilität des Kristalls, d.h., daß der Kristall seine Struktur nicht durch strukturelle Umlagerungen der kristallisierten Proteine verlieren darf, da er dadurch auch sein Diffraktionsvermögen verlieren würde.

10

Die vorliegende Erfindung wird durch die Figuren 4 und 5 näher erläutert:

**Figur 4:** Der kovalent gebundene Inhibitor sowie einzelne Aminosäuren in der Umgebung des Aktiven Zentrums des Thrombins um Ser195 sind als stick-Modell dargestellt. Sauerstoffatome sind rot, Schwefelatome gelb, Stickstoffatome blau und Kohlenstoffatome grau dargestellt. Der Inhibitor ist zusätzlich von seiner  $2F_o - F_c$ -Elektronendichte (kontouriert bei  $1\sigma$ ) überlagert. Der Inhibitor ist in seiner Elektronendichte eindeutig definiert.

In der experimentell bestimmten Elektronendichte ist deutlich die kovalente Bindung des PMSFs am Ser195 zu erkennen (Figur 4), die sich von der des ursprünglich im Kristall gebundenen Benzamidins signifikant unterscheidet. Damit wurde der Beweis geführt, daß der Ansatz des Auftropfens von Picoliter-Tropfen auf einen Proteinkristall unter Verwendung des Free Mounting Systems funktioniert

25 **Figur 5:**

Das Spaltprodukt Pro-Ile des Inhibitors Diprotin A sowie einzelne Aminosäuren in der Umgebung des Aktiven Zentrums der DPIV um Ser630 sind als stick-Modell dargestellt. Sauerstoffatome sind rot, Stickstoffatome blau und Kohlenstoffatome grau dargestellt. Der Inhibitor sowie Ser630, das kovalent an den Inhibitor gekoppelt ist, ist zusätzlich von seiner  $2F_o - F_c$ -Elektronendichte (kontouriert bei  $1\sigma$ ) überlagert. Der Inhibitor ist in seiner Elektronendichte eindeutig definiert (Figur 5).

30

Vom eingesetzten Tripeptid mit der Sequenz Ile-Pro-Ile ist das C-terminale Isoleucin abgespalten, während das Dipeptid kovalent mit Ser630 weiterhin verknüpft ist und nicht abgespalten wird. Insofern verhält sich Diprotin A eher wie ein Suizid-Substrat und nicht wie ein Inhibitor.

5

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Ausführungsbeispiele näher beschrieben.

### Ausführungsbeispiele

#### 10 1. Ausführungsbeispiel

##### Komplex mit einer Fragmentspezies, Trägerflüssigkeit: Wasser

Es wurde Benzamidin als Ligand und Faktor Xa als Zielenzym eingesetzt. Benzamidin wurde in Wasser in einer 100 mM Konzentration gelöst. Der Faktor-Xa-Kristall wurde in der FMS-Apparatur bei der zuvor ermittelten relativen Feuchte des Muttertropfens von 95% frei montiert. Durch zueinander orthogonale Projektionsaufnahmen konnte das Volumen des Kristalls montiert werden, typische Volumina von Proteinkristallen betragen 1 nl ( $100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ ). Die Konzentration des Proteins im Kristall betrug ca. 1000 mg/ml, entsprechend einer Konzentration von ca. 30 mM.

Mittels stroboskopischer Aufnahmen wurde der Tropfendurchmesser und damit das Tropfenvolumen bestimmt und zu 5 pl eingestellt. Demgemäß war ein gesamtes Auftropfvolumen von 333 pl entsprechend 67 Tropfen nötig, um alle primären Bindestellen im Kristall äquimolar zu besetzen. Faktor Xa weist eine sekundäre Benzamidin-Bindestelle schwacher Affinität auf, so dass zur (einfachen) Besetzung beider Bindestellen ein theoretisches Aufspritzzvolumen von 666 pl nötig war. Zur vollständigen Besetzung der sekundären Bindestelle wurde ein zehnfacher Ligandenüberschuß eingestellt, weswegen insgesamt 1340 Tropfen auf den Kristall aufgespritzt wurden. Die resultierende Ligandkonzentration im Kristall betrug somit 600 mM.

Während des Aufspritzzvorgangs wurde die Projektion des Kristallvolumens verfolgt. Der Aufspritzzvorgang wurde ausgesetzt, wenn das Kristallvolumen um mehr als 10% vom Ausgangsvolumen zunahm, und setzte erst wieder ein, wenn das Kristallvolumen sich bis auf 2%

30

dem Ausgangsvolumen angenähert hatte. Nach Beendigung des Aufspritzvorgangs wurde der Kristall vollständig an den Ausgangsfeuchte-Gleichgewichtszustand äquilibriert, was durch die asymptotische Angleichung des Kristallvolumens an das Ausgangsvolumen verfolgt wurde. Der Kristall wurde sodann durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff stabilisiert und  
5 röntgenkristallographisch vermessen.

Zur Berechnung des aufzubringenden Flüssigkeitsvolumens lässt sich allgemein feststellen, dass die Berechnung des aufzubringenden Flüssigkeitsvolumens, wie folgt, erfolgt: Die insgesamt aufzutropfende Flüssigkeitsmenge hängt von (i) der Konzentration des Liganden in der Trägerflüssigkeit; (ii) dem Kristallvolumen und (iii) der Konzentration der Proteinbindestellen ("aktive Zentren") ab. Um schließlich die benötigte Anzahl von aufzuspritzenden Piko-  
10 Tropfen zu ermitteln muß (iv) das Tropfenvolumen bestimmt werden. Dabei geht die weitergehende Annahme ein, dass die effektiv-wirksame Ligandenmenge der aufgespritzten Ligandenmenge entspricht, insbesondere also keine Präzipitation des Liganden an der Kristalloberfläche auftritt. Ein solches Präzipitationsrisiko besteht bei schlecht wasserlöslichen Substanzen. Diese Substanzen werden oftmals unter Verwendung von Lösungsmitteln (z.B. DMSO) auf den Kristall aufgespritzt, wobei die Ligandenkonzentration so eingestellt wird, dass keine Präzipitation an der Kristalloberfläche auftritt. Die korrekte Konzentrationseinstellung und das daraus resultierende präzipitationsfreie Aufspritzen werden unter einem Mikroskop kon-  
15 trolliert.  
20

Bestimmung der experimentellen Parameter: (i) Die Konzentration wird definiert eingestellt, z.B. durch Einwaage; (ii) Das Kristallvolumen wird durch eine Serie von Projektionsaufnahmen bei verschiedenen Kristallorientierungen durch das Verfahren der Rückprojektion experimentell bestimmt. (iii) Proteinkristalle enthalten einen Wassergehalt von typischerweise  
25 50%. Dies entspricht einer Proteinkonzentration von ca. 1000 mg/ml. Unter Verwendung des Molekulargewichts des Proteins und Berücksichtigung der Anzahl der (aktiven) Proteinbindestellen kann die Konzentration der Bindestellen berechnet werden. Beispielsweise wäre diese Konzentration bei einem 100 kDa Protein mit einer active site 10 mM. (iv) Unter Ver-  
30 wendung eines Stroboskops kann die Tropfenprojektion vermessen werden. Da der Tropfen in sehr guter Näherung kugelförmig ist, kann das Tropfenvolumen einfach berechnet werden.

Zu beachten ist, dass für die Berechnung der benötigten Tropfenanzahl bei (ii) und (iv) nicht die absoluten sondern nur die relativen Volumina ausschlaggebend sind.

## 5 2. Ausführungsbeispiel

### **Komplex mit einer Fragmentspezies, Trägerflüssigkeit: DMSO**

Es wurde PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) als Ligand und Faktor Xa als Zielenzym eingesetzt. Bei Verwendung von DMSO muß insbesondere bei schlechten löslichen Verbindungen darauf geachtet werden, dass die mit DMSO gelöste Substanz nach dem Aufspritzen auf den Kristall nicht präzipitiert. Die Löslichkeit typischer chemischer Substanzen hängt vom DMSO-Anteil parabolisch ab. Dieser nicht-lineare Zusammenhang begründet die Präzipitationsgefahr der Substanz auf dem Kristall bei Vermischung des Löslichkeitsvermittlers DMSO mit dem Kristallwasser. Daher wurde in einem Vorversuch die Löslichkeit der Substanz bei 15 50% DMSO ermittelt. Dies ist die maximale Konzentration, die in 100% DMSO aufgebracht werden kann. Für PMSF zeigte sich, dass PMSF bei 50% DMSO zu (mindestens) 10 mM gelöst war. Die Substanz wurde daher in 100% DMSO gelöst und mit 10 mM Konzentration beim Aufspritzexperiment eingesetzt. Bei einem Kristallvolumen von 1 nl und einer einzigen Proteinbindestelle mußten daher 30 nl für äquimolare Besetzung aufgebracht werden, für 20 doppelte Besetzung (einfachen Überschuss) sind theoretisch 60 nl nötig. Bei Verwendung von 10 µl Tropfenvolumina wurden 6000 Tropfen auf den Kristall aufgespritzt. Der Vorgang wurde, wie im Anwendungsbeispiel 1 gezeigt, über die Messung der Kristallprojektion verfolgt und kontrolliert.

## 25 3. Ausführungsbeispiel

### **Komplex mit mehreren verschiedenen Fragmentspezies, Trägerflüssigkeit: DMSO**

Das Zielenzym war DPIV (Dipeptidylpeptidase IV). Verschiedene Fragmente wurden in einem Cocktail miteinander in Lösung gebracht. In einem Cocktail (i) wurde Moleküle von zwei verschiedenen Molekülspezies miteinander kombiniert, und zwar ein Mimetikum (verändertes 30 Peptidrückgrat (Vinylderivat) des N-terminalen Dipeptids eines Substrats der DPIV (mit freiem N-Terminus) und andererseits ein Mimetikum (ebenfalls ein Dipeptid mit acetyliertem, blockiertem N-Terminus, ebenfalls als Gerüstmimetikum - Vinylderivat). In einem zweiten Cocktail (ii) wurden jeweils fünf verschiedenen Molekülspezies (die sich in bezug auf die bei-



den Seitenketten der beiden Dipeptidmimetika unterschieden) der beiden Mimetikaklassen, also insgesamt 10 Molekülspezies, in einem Cocktail kombiniert.

In einem Vorversuch wurde entsprechend Beispiel 2 die (Mindest-)Löslichkeit jeder Substanz bei 50% DMSO ermittelt, die hier zu 10 mM bestimmt wurde. Die DPIV kristallisiert als Tetramer mit einem Molekulargewicht von ca. 400 kDa, mit vier Bindestellen pro Tetramer. Die Konzentration der DPIV-Bindestellen im Kristall ist daher 10 mM. Bei einem Kristallvolumen von 1 nl wurde daher insgesamt 1 nl einer 100% DMSO Cocktail-Mischung aufgetragen, die jede Substanz mit einer 10 mM Konzentration gelöst hatte. Das weitere Vorgehen entsprach dann dem der Beispiele 1 und 2.

Auf erfindungsgemäße Weise lassen sich damit Fragmente an den Kristall binden, die mit klassischen „Soaking“-Prozessen nicht gebunden werden können. Zudem ist ein solches erfindungsgemäßes Verfahren im Vergleich zu bisherigen „Soaking“-Prozessen mit geringerem Zeitaufwand verbunden, da wegen der schonenderen Kristallbehandlung weniger Versuche unternommen werden müssen, um die Kristallbehandlung erfolgreich zum Abschluß zu bringen. Insbesondere aber lassen sich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren schwach bindende (bspw.  $10^{-3}$  M) Substanzen mit Fragmentcharakter identifizieren, die sich in Lösung nicht mit einem Kristall komplexieren ließen, da Proteine in Lösung mindestens 100fach niedriger konzentriert sind als in einem entsprechenden Proteinkristall. Damit eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren zum Fragment-basierten de novo Wirkstoffdesign durch Verknüpfung von verschiedenen erfindungsgemäß aufgefundenen Fragmenten (und damit einer entsprechenden Erhöhung der Bindungsaffinität). Schließlich kann das erfindungsgemäße Verfahren auch zur Fragment-basierten Wirkstoffverfeinerung genutzt werden, indem die aufgefundenen Fragmente oder das aufgefundene Fragment mit einem bekannten Inhibitor bspw. verknüpft oder ein bekannter Inhibitor strukturell modifiziert wird und dadurch die Affinität verbessert werden kann. Damit sind erfindungsgemäße Verfahren auch Bestandteil von allgemeinen Verfahren, die zur Identifikation von Liganden eines Zielproteins dienen können.

Ansprüche

- 5
1. Verfahren zum Behandeln eines Kristalls mit einer Lösung, enthaltend eine oder mehr Molekülspezies, wobei die Moleküle ein Molekulargewicht von  $< 500$  Da aufweisen, mit den folgenden Schritten:
- 10
- es wird der Kristall auf einer Halterungsvorrichtung befestigt, insbesondere ohne in einer flüssigen Umgebung eingebettet zu sein, und
  - es werden Mikrotropfen der Flüssigkeit auf den Kristall aufgebracht.
- 15
2. Verfahren zum Behandeln eines Kristalls nach Anspruch 1, wobei die in der Lösung enthaltenden Moleküle ein Molekulargewicht von  $< 200$  Da aufweisen.
3. Verfahren zum Behandeln eines Kristalls nach Anspruch 1 oder 2, wobei die in der Lösung enthaltenden Moleküle ein Molekulargewicht von  $< 100$  Da aufweisen.
- 20
4. Verfahren zum Behandeln eines Kristalls nach einem der vorgenannten Ansprüche, wobei der Kristall ein Proteinkristall ist.
- 25
5. Verfahren zum Behandeln eines Kristalls nach einem der vorgenannten Ansprüche, wobei die in der Lösung enthaltenen Moleküle als Liganden an die Proteine im Proteinkristall binden, vorzugsweise mit einer Affinität zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  M.
- 30
6. Verfahren zum Behandeln eines Kristalls nach einem der vorgenannten Ansprüche, wobei die in der Lösung enthaltenen Moleküle bzw. die Moleküle mindestens einer in der Lösung enthaltenen Molekülspezies mindestens ein elektronenreiches oder anomales Röntgenstreuungszentrum, vorzugsweise ein Schwer(metall)atom, aufweisen.
7. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche, bei dem darüber hinaus während des Aufbringens der Mikro-Tropfen auf den Kristall um den Kristall herum eine definierte Umgebung erzeugt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, bei dem das Erzeugen der definierten Umgebung das Erzeugen eines Gasstroms definierter Zusammensetzung um den Kristall herum umfaßt.
- 5 9. Verfahren nach Anspruch 8, bei dem der Gasstrom aus einem Luftstrom mit kontrollierter Luftfeuchtigkeit besteht.
10. Verfahren nach Anspruch 8, bei dem der Gasstrom während des Auftropfens geregelt wird.
- 10 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 oder 10, bei dem die Luftfeuchtigkeit des Gasstroms und die Frequenz, mit der die Tropfen durch das Mikrodosiersystem auf den Kristall aufgetropft werden, während des Auftropfens so aufeinander abgestimmt werden, daß der Kristall möglichst wenig belastet wird, insbesondere das Volumen des Kristalls sich um nicht mehr als 20%, insbesondere um nicht mehr als 10% verändert.
- 15 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 11, bei dem der Gasstrom einen Lösungsmittler in kontrollierter Konzentration für eine auf den Kristall aufzubringende Substanz umfaßt.
- 20 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, bei dem das Volumen der Mikro-Tropfen kleiner als das Volumen des Kristalls ist.
- 25 14. Verfahren nach Anspruch 13, bei dem die Mikro-Tropfen der Lösung ein Volumen zwischen 1 nl und 100 pl, vorzugsweise zwischen 100 pl und 20 pl und noch bevorzugt zwischen 20 pl und 4 pl aufweisen.
- 30 15. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche 1 bis 14, wobei die die Molekülspezies enthaltende und auf den Kristall aufgetragene Lösung eine wässrige Lösung oder eine zumindest teilweise organische Lösungsmittel umfassende, ggf. auf eine Temperatur oberhalb von 20°C erwärmte, Lösung ist.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die die Molekülspezies enthaltende Lösung aus einem flüchtigen organischen Lösungsmittel besteht oder dieses enthält.
- 5 17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Lösungsmittel DMSO enthält oder aus DMSO besteht.
18. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, wobei das die Molekülspezies enthaltende Lösungsmittel ein bei einer Temperatur von weniger als 100°C siedendes, bevorzugt  
10 vollständig flüchtiges, organisches Lösungsmittel ist oder dieses enthält.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, wobei das Lösungsmittel DMSO, Trifluorethanol, Aceton, Chloroform und/oder Methanol enthält.
- 15 20. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche, wobei die in der auf den Kristall aufzubringenden Lösung enthaltenen Moleküle schwer wasserlöslich sind.
21. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche, wobei die Lösung einen Cocktail von mindestens 3, stärker bevorzugt mindestens 10, noch stärker bevorzugt mindestens 20 und am stärksten bevorzugt mindestens 50 verschiedenen Molekülspezies  
20 enthält.
22. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche, wobei die Lösung die mindestens eine Molekülspezies in einer Konzentration von  $10^{-1}$  bis  $10^{-3}$ M enthält.  
25
23. Verfahren nach einem der vorgenannten Ansprüche, wobei dem Verfahren ein Verfahrensschritt vorgeschaltet ist, mit dem potentiell an eine Zielstruktur bindende Fragmente identifiziert werden, insbesondere ein Verfahrensschritt, der auf einem spektroskopischen Verfahren, bspw. NMR-Spektroskopie oder Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie, oder einem in silico Docking Verfahren beruht.  
30

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, bei dem der Gasstrom eine oder mehrere Substanzen enthält, die einen oder mehrere Liganden und/oder Inhibitoren enthält bzw. enthalten.
- 5 25. Verfahren zur Ermittlung einer kristallographischen Struktur eines Komplexes eines bspw. Proteins und mindestens einer Molekülspezies, wobei (a) die Verfahrensschritte nach einem der Ansprüche 1 bis 24 durchgeführt werden, (b) der Kristall mit Röntgenstrahlung oder Synchrotronstrahlung bestrahlt wird und (c) das Beugungsbild des Kristalls aufgenommen wird.
- 10 26. Verfahren zur Ermittlung einer kristallographischen Struktur nach Anspruch 25, wobei (d) unter Verwendung von Phaseninformation und der Intensitäten der Reflexe im Beugungsbild eine Elektronendichtekarte errechnet und die Bindungsstelle und Positionierung der mindestens einen gebundenen Molekülspezies in der bspw. Proteinstruktur bestimmt wird.
- 15 27. Verfahren nach Anspruch 26, bei dem die Phaseninformation durch die Verwendung von Schwermetallatomderivaten („isomorphe Ersetzung“), „molecular replacement“ oder MAD (multiple anomalous scattering) erhalten wird.
- 20 28. Verfahren zur Ermittlung einer kristallographischen Struktur nach Anspruch 26 oder 27, wobei die Bindungsstelle und Positionierung der mindestens einen gebundenen Molekülspezies in der bspw. Proteinstruktur aus der Differenz der Elektronendichten von nicht-komplexierter und komplexierter Struktur durch eine Differenzelektronendichtekarte bestimmt wird.
- 25 29. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 27, bei dem die Bestrahlung mit monochromatischer Röntgenstrahlung oder mit Synchrotronstrahlung während der Behandlung des Kristalls mit der Lösung stattfindet.
- 30 30. Verfahren zur Identifikation von ein kristallisiertes Protein bindenden Molekülen, bei dem (a) mindestens eine Molekülspezies nach einem Verfahren nach einem der An-

sprüche 1 bis 24 auf den Kristall aufgebracht wird, (b) in einem zeitlichen Abstand von variabler Länge Beugungsintensitäten gemessen werden und (c) diese im zeitlichen Abstand gemessenen Beugungsintensitäten entsprechend ihrer zeitlichen Abfolge miteinander verglichen werden.

5

31. Verfahren zur Identifikation von einem eine Zielstruktur bindenden Liganden, wobei (a) ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24 durchgeführt wird, (b) nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 29 die Struktur von mindestens einem Komplexes mit mindestens zwei Fragmenten ermittelt wird, (c) Linker zwischen den mindestens zwei Fragmenten zu einem Liganden ermittelt wird/werden und (d) ein Ligand, enthaltend die mindestens zwei Fragmente und den mindestens einen Linker, synthetisiert wird.

10

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, wobei das Verfahren unter Verwendung einer Vorrichtung zum Behandeln eines Kristalls mit einer Flüssigkeit mit einer Halterung zur Befestigung des Kristalls und mindestens einem Mikrodosiersystem, das im Verhältnis zur Halterung so angeordnet ist, daß damit Mikro-Tropfen der Flüssigkeit auf den in der Halterung befestigten Kristall aufgebracht werden können, durchgeführt wird.

15

20

33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei die verfahrensgemäß eingesetzte Vorrichtung darüber hinaus ein Mittel umfaßt, mit dem während des Auftropfens der Flüssigkeit um den Kristall herum eine definierte Umgebung erzeugt werden kann.

25 34. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 oder 33, bei dem das Mittel das Erzeugen der definierten Umgebung dadurch erlaubt, dass ein Gasstrom definierter Zusammensetzung um den Kristall herum erzeugt wird.

30

35. Verfahren nach Anspruch 32 oder 34, bei der die Halterung darüber hinaus so ausgebildet ist, daß durch die Halterung der Gasstrom so geführt werden kann, daß er auf den in der Halterung befestigten Kristall gerichtet ist.

36. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem eine Vorrichtung mit einer Halterung aus einem Trägerblock für eine Haltekapillare eingesetzt wird, die ein freies Auflageende für den Kristall besitzt.
- 5 37. Verfahren nach Anspruch 36, bei dem eine Vorrichtung mit einer Haltekapillare aus einer Mikropipette eingesetzt wird, in der sich ein Unterdruck erzeugen läßt, um den Kristall zu halten.
- 10 38. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 oder 37, bei dem der Trägerblock der Halterung der verfahrensgemäß eingesetzten Vorrichtung einen integralen Gaskanal mit einem Mündungsende enthält, das auf das Auflageende der Haltekapillare gerichtet ist.
- 15 39. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 38, bei dem eine Vorrichtung eingesetzt wird, die darüber hinaus ein Gasmischmittel aufweist, mit dem die Zusammensetzung des Gasstroms variabel eingestellt werden kann.
- 20 40. Verfahren nach Anspruch 39, bei dem eine Vorrichtung eingesetzt wird, bei der das Gas aus Luft mit einem bestimmten Feuchtigkeitsgehalt besteht und das Gasmischmittel so ausgebildet ist, daß damit die Luftfeuchtigkeit eingestellt werden kann.
- 25 41. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 40, bei dem eine Vorrichtung eingesetzt wird, die darüber hinaus ein Lösungsvermittlerbeigabemittel umfaßt, mit dem dem Gasstrom ein Lösungsvermittler für eine in die Kristallstruktur des Kristalls einzubringende Substanz beigemischt werden kann.
42. Verfahren nach Anspruch 41, bei dem eine Vorrichtung eingesetzt wird, die darüber hinaus ein Konzentrationseinstellmittel zur Einstellung der Konzentration des Lösungsvermittlers umfaßt.
- 30 43. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 42, bei dem eine Vorrichtung eingesetzt wird, die darüber hinaus ein Temperatureinstellmittel umfaßt, mit dem die Temperatur des Gasstroms variabel eingestellt werden kann.

44. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem eine Vorrichtung eingesetzt wird, bei der das Mikrodosiersystem so ausgebildet ist, daß es Mikro-Tropfen der auf den Kristall aufzubringenden Flüssigkeit erzeugen kann, die ein Volumen aufweisen, das kleiner als das Volumen des Kristalls ist.
45. Verfahren nach Anspruch 44, bei dem eine Vorrichtung eingesetzt wird, bei der das Mikrodosiersystem so ausgebildet ist, daß es Mikro-Tropfen erzeugen kann, deren Volumen zwischen 10 und 20 Prozent des Kristallvolumens und vorzugsweise zwischen 5 und 10 Prozent des Kristallvolumens beträgt.
46. Verfahren nach einem der Ansprüche 42 oder 43, bei der das Mikrodosiersystem so ausgebildet ist, daß es Mikro-Tropfen erzeugen kann, deren Volumen zwischen 1 nl und 100 pl, vorzugsweise zwischen 100 pl und 20 pl und noch bevorzugt zwischen 20 pl und 4 pl liegt.
47. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem eine Vorrichtung eingesetzt wird, bei der das Mikrodosiersystem darüber hinaus ein Flüssigkeitszufuhrsystem aufweist, mit dem verschiedene Flüssigkeiten, die auf den Kristall aufgetropft werden sollen, in zeitlich gesteuerter Weise einem Tropfenerzeugungsteil des Mikrodosiersystems zugeführt werden können.
48. Verfahren nach Anspruch 47, bei dem eine Vorrichtung eingesetzt wird, bei der das Flüssigkeitszufuhrsystem des Mikrodosiersystems umfaßt eine elektrisch ansteuerbare Präzisionsspritze und ein Leitungssystem umfaßt, mit dem die Präzisionsspritze über elektrisch steuerbare Ventile mit verschiedenen Flüssigkeitsvorratsbehältern und mit dem Tropfenerzeugungsteil des Mikrodosiersystems verbunden werden kann, um diesem Flüssigkeit für die Tropfenerzeugung zuzuführen.
49. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem eine Vorrichtung eingesetzt wird, bei der das Mikrodosiersystem so ausgebildet ist, daß es eine Piezopipette umfaßt, die das Tropfenerzeugungsteil bildet.



50. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem der Kristall mit Hilfe eines Verdampfers mit Lösungsmittel, insbesondere organischem Lösungsmittel, be-  
dampft wird.
- 5 51. Verfahren zur röntgenkristallographischen Strukturaufklärung im Hochdurchsatz, bei dem (a) der Kristall bzw. die Kristalle, vorzugsweise frei montiert, vorgehalten werden, (b) auf die vorzugsweise frei montierten Kristalle Mikrotropfen einer bspw. min-  
destens einen Liganden enthaltenden Lösung aufgetragen werden, (c) die gemäß Ver-  
fahrensschritt (b) behandelten Kristalle gelagert werden und (d) die Kristalle rönt-  
10 genkristallographische untersucht werden.

1/5

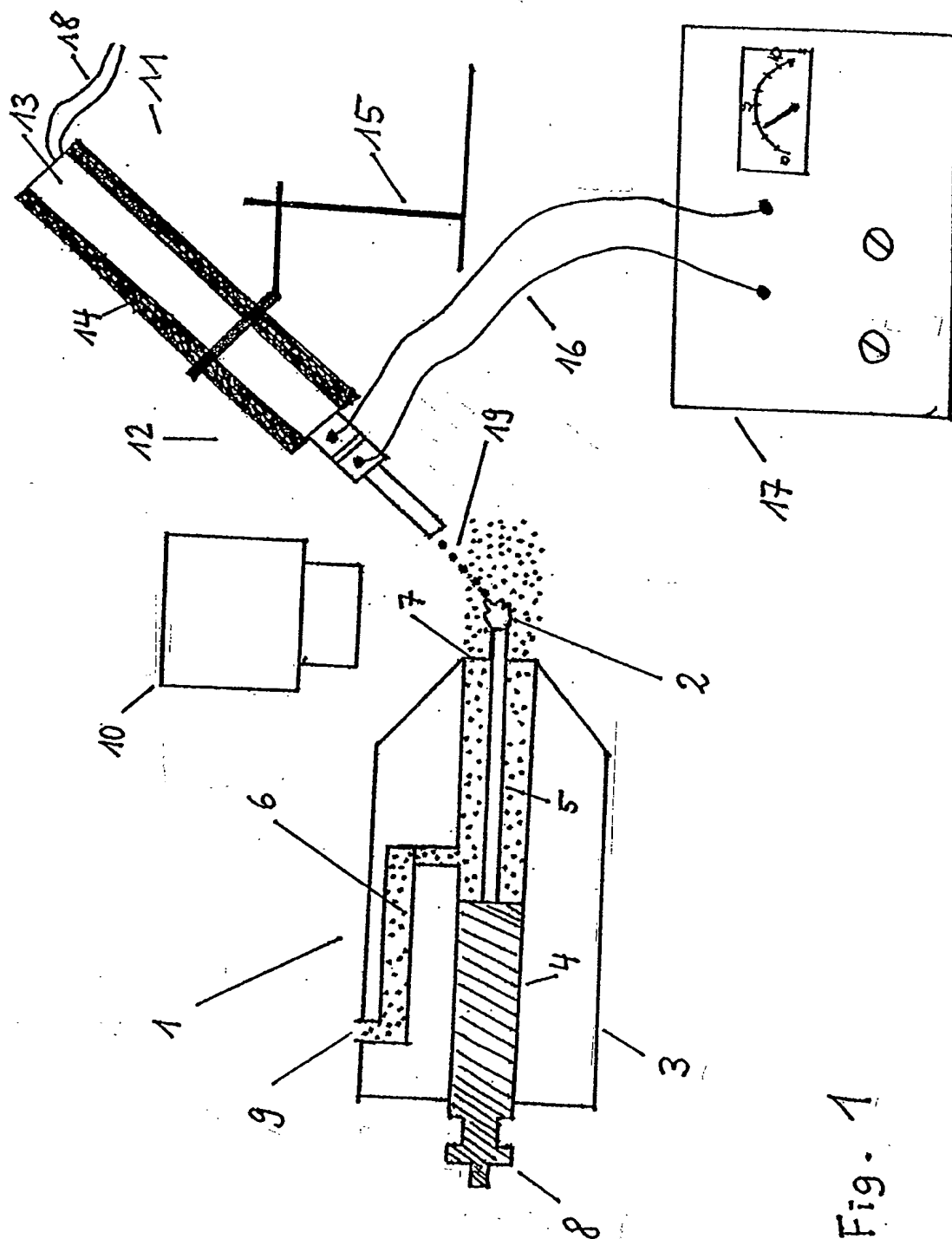


Fig. 1

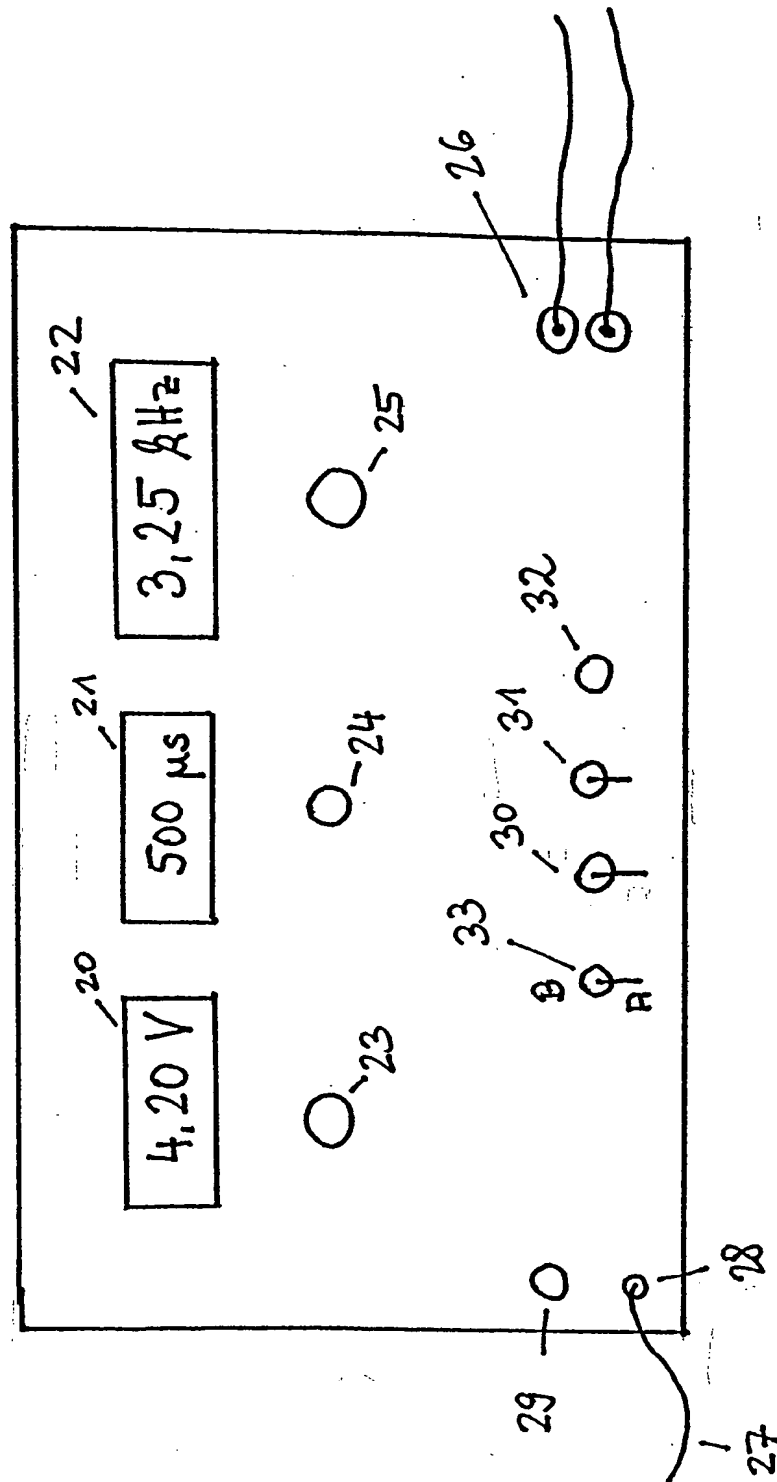
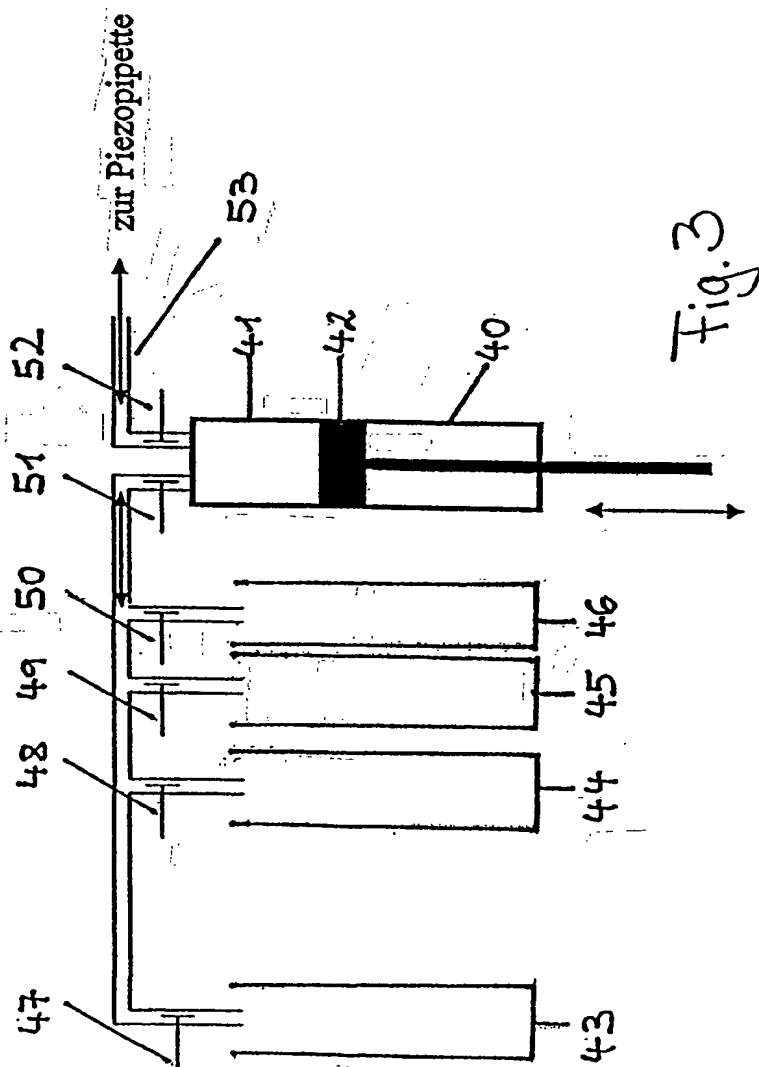


Fig. 2



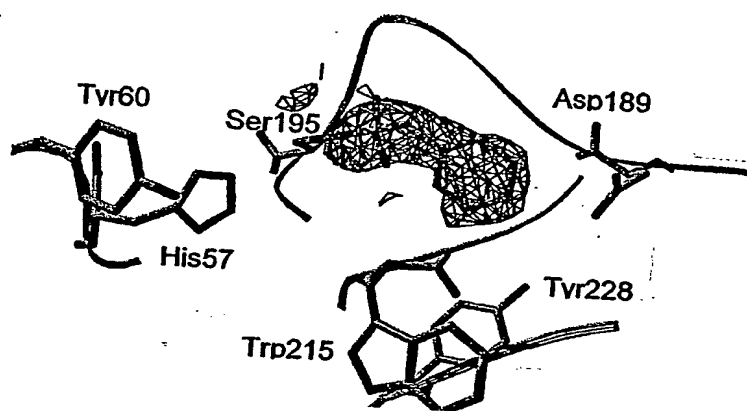


Fig. 4

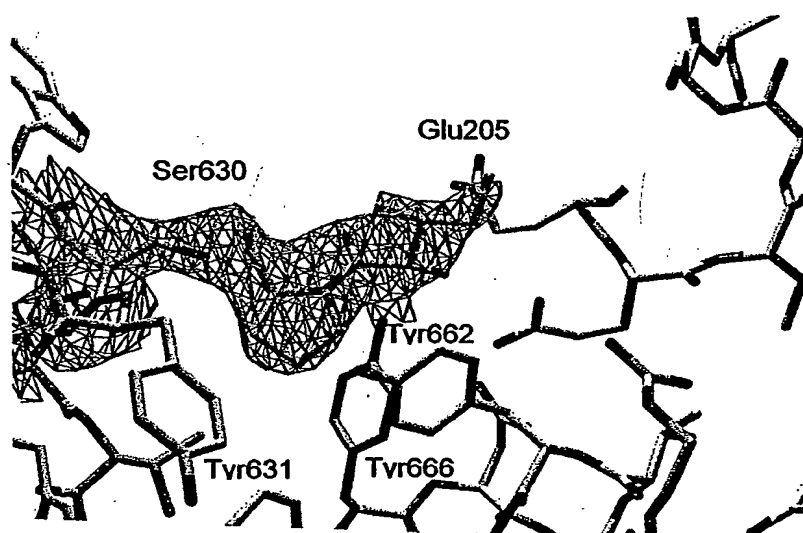


Fig. 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/008813

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/68 B01J19/00 C30B7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C30B B01J G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, INSPEC

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/191048 A1 (STEARNS RICHARD G ET AL) 19 December 2002 (2002-12-19) paragraph '0090!; figures 2B, 2C, 4A, 4B, 4C paragraph '0132! - paragraph '0133! paragraph '0149! - paragraph '0150! paragraph '0161! paragraph '0184!	1-5, 51
X	US 2003/049642 A1 (CEDERGREN EILA ET AL) 13 March 2003 (2003-03-13) Absatz '0116!, Sätze 1, 2; figures 3, 5A	1-5, 51
X	US 2002/153055 A1 (DOWNS ROBERT C ET AL) 24 October 2002 (2002-10-24)	1-5, 51
Y	paragraph '0045!  paragraph '0050!	6-35, 39-50
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 November 2004

Date of mailing of the international search report

24/11/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Strohmayer, B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/008813

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LESUISSE DOMINIQUE ET AL: "SAR and X-ray. A new approach combining fragment-based screening and rational drug design: application to the discovery of nanomolar inhibitors of Src SH2." JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY. 6 JUN 2002, vol. 45, no. 12, 6 June 2002 (2002-06-06), pages 2379-2387, XP002303799 ISSN: 0022-2623 cited in the application Absätze "Soaking of the Crystals with Ligands" und "Protein Crystallography" auf Seite 2384</p>	1-5, 51
X	<p>STEWART P S ET AL: "A comparison of microbatch and vapour diffusion for initial screening of crystallization conditions" JOURNAL OF CRYSTAL GROWTH, NORTH-HOLLAND PUBLISHING CO. AMSTERDAM, NL, vol. 168, no. 1, 1 October 1996 (1996-10-01), pages 170-174, XP004013784 ISSN: 0022-0248 Seite 172, linke Spalte, die letzten beiden Sätze des Absatzes (iii)</p>	1-5, 51
X	<p>CLEMONS W M ET AL: "Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from Thermus thermophilus: purification, crystallization and structure determination" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 310, no. 4, 20 July 2001 (2001-07-20), pages 827-843, XP004480481 ISSN: 0022-2836 Seite 840, der erste Satz des Absatzes "Cryoprotection, flash cooling and screening of crystals"</p>	1-5, 51
Y	<p>BLUNDELL T L ET AL: "HIGH-THROUGHPUT CRYSTALLOGRAPHY FOR LEAD DISCOVERY IN DRUG DESIGN" NATURE REVIEWS. DRUG DISCOVERY, NATURE PUBLISHING GROUP, BASINGSTOKE, GB, vol. 1, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 45-54, XP009023187 ISSN: 1474-1784 cited in the application BOX 1 auf Seite 46 page 48 page 51, right-hand column, paragraph 2 - page 52, left-hand column, paragraph 2</p>	6-35, 39-50
	----- -/--	



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/008813

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 198 42 797 C (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 27 January 2000 (2000-01-27) cited in the application the whole document	1-51
A	NIENABER V L ET AL: "Discovering novel ligands for macromolecules using X-ray crystallographic screening" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 18, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 1105-1108, XP002250092 ISSN: 1087-0156 cited in the application figure 1	1-51
A	EP 0 278 131 A (BOC GROUP PLC) 17 August 1988 (1988-08-17) column 3, line 40 - line 55; figure 1	1
A	WO 99/45379 A (ABBOTT LAB) 10 September 1999 (1999-09-10) abstract	1-51

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/008813

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002191048	A1	19-12-2002	US 2003048341 A1	13-03-2003
			US 2002061258 A1	23-05-2002
			EP 1352112 A1	15-10-2003
			WO 02066713 A1	29-08-2002
			AU 2433602 A	02-04-2002
			AU 9311101 A	02-04-2002
			AU 9473301 A	02-04-2002
			CA 2423063 A1	28-03-2002
			CA 2423068 A1	28-03-2002
			EP 1324823 A2	09-07-2003
			EP 1337325 A2	27-08-2003
			JP 2004518520 T	24-06-2004
			JP 2004518411 T	24-06-2004
			WO 0224323 A2	28-03-2002
			WO 0224324 A2	28-03-2002
			WO 0224325 A2	28-03-2002
			US 2003052943 A1	20-03-2003
			US 2003138852 A1	24-07-2003
			US 2004119793 A1	24-06-2004
			US 2002085063 A1	04-07-2002
			US 2002061598 A1	23-05-2002
			US 2002037579 A1	28-03-2002
			US 2002037527 A1	28-03-2002
US 2003049642	A1	13-03-2003	CA 2434886 A1	25-07-2002
			EP 1360349 A1	12-11-2003
			WO 02057520 A1	25-07-2002
US 2002153055	A1	24-10-2002	US 2002139439 A1	03-10-2002
			WO 02076830 A1	03-10-2002
DE 19842797	C	27-01-2000	DE 19842797 C1	27-01-2000
			AT 219834 T	15-07-2002
			DE 59901839 D1	01-08-2002
			EP 0987543 A2	22-03-2000
			US 6355217 B1	12-03-2002
EP 0278131	A	17-08-1988	EP 0278131 A1	17-08-1988
			DE 3771482 D1	22-08-1991
			GB 2183500 A ,B	10-06-1987
WO 9945379	A	10-09-1999	AU 2887099 A	20-09-1999
			AU 767991 B2	27-11-2003
			AU 2987899 A	20-09-1999
			BG 104802 A	30-04-2001
			BR 9908563 A	21-11-2000
			CA 2321968 A1	10-09-1999
			CN 1299467 T	13-06-2001
			EP 1068531 A2	17-01-2001
			HU 0101959 A2	28-09-2001
			JP 2002506206 T	26-02-2002
			NO 20004433 A	06-11-2000
			PL 343264 A1	30-07-2001
			SK 13242000 A3	12-03-2001
			TR 200002572 T2	21-11-2000
			TR 200101127 T2	21-06-2002
			TR 200101129 T2	21-06-2002
			TR 200101200 T2	21-02-2002

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/008813

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9945379	A	WO 9945389 A2	10-09-1999
		WO 9945379 A2	10-09-1999
		US 6297021 B1	02-10-2001
<hr/>			

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2004/008813

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 7 G01N33/68 B01J19/00 C30B7/00		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C30B B01J G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, INSPEC		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2002/191048 A1 (STEARNS RICHARD G ET AL) 19. Dezember 2002 (2002-12-19) Absatz '0090!; Abbildungen 2B, 2C, 4A, 4B, 4C Absatz '0132! - Absatz '0133! Absatz '0149! - Absatz '0150! Absatz '0161! Absatz '0184!	1-5, 51
X	US 2003/049642 A1 (CEDERGREN EILA ET AL) 13. März 2003 (2003-03-13) Absatz '0116!, Sätze 1, 2; Abbildungen 3, 5A	1-5, 51
X	US 2002/153055 A1 (DOWNS ROBERT C ET AL) 24. Oktober 2002 (2002-10-24)	1-5, 51
Y	Absatz '0045!  Absatz '0050!	6-35, 39-50
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</li> <li>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</li> <li>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</li> <li>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</li> <li>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</li> <li>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</li> <li>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</li> <li>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</li> <li>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</li> <li>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</li> </ul>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  4. November 2004		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts  24/11/2004
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Strohmayer, B

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2004/008813

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>LESUISSE DOMINIQUE ET AL: "SAR and X-ray. A new approach combining fragment-based screening and rational drug design: application to the discovery of nanomolar inhibitors of Src SH2." JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY. 6 JUN 2002, Bd. 45, Nr. 12, 6. Juni 2002 (2002-06-06), Seiten 2379-2387, XP002303799 ISSN: 0022-2623 in der Anmeldung erwähnt Absätze "Soaking of the Crystals with Ligands" und "Protein Crystallography" auf Seite 2384</p>	1-5,51
X	<p>----- STEWART P S ET AL: "A comparison of microbatch and vapour diffusion for initial screening of crystallization conditions" JOURNAL OF CRYSTAL GROWTH, NORTH-HOLLAND PUBLISHING CO. AMSTERDAM, NL, Bd. 168, Nr. 1, 1. Oktober 1996 (1996-10-01), Seiten 170-174, XP004013784 ISSN: 0022-0248 Seite 172, linke Spalte, die letzten beiden Sätze des Absatzes (iii)</p>	1-5,51
X	<p>----- CLEMONS W M ET AL: "Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from Thermus thermophilus: purification, crystallization and structure determination" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, Bd. 310, Nr. 4, 20. Juli 2001 (2001-07-20), Seiten 827-843, XP004480481 ISSN: 0022-2836 Seite 840, der erste Satz des Absatzes "Cryoprotection, flash cooling and screening of crystals"</p>	1-5,51
Y	<p>----- BLUNDELL T L ET AL: "HIGH-THROUGHPUT CRYSTALLOGRAPHY FOR LEAD DISCOVERY IN DRUG DESIGN" NATURE REVIEWS. DRUG DISCOVERY, NATURE PUBLISHING GROUP, BASINGSTOKE, GB, Bd. 1, Nr. 1, Januar 2002 (2002-01), Seiten 45-54, XP009023187 ISSN: 1474-1784 in der Anmeldung erwähnt BOX 1 auf Seite 46 Seite 48 Seite 51, rechte Spalte, Absatz 2 - Seite 52, linke Spalte, Absatz 2</p> <p>----- -/--</p>	6-35, 39-50

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/008813

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 198 42 797 C (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 27. Januar 2000 (2000-01-27) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-51
A	NIENABER V L ET AL: "Discovering novel ligands for macromolecules using X-ray crystallographic screening" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, Bd. 18, Nr. 10, Oktober 2000 (2000-10), Seiten 1105-1108, XP002250092 ISSN: 1087-0156 in der Anmeldung erwähnt Abbildung 1	1-51
A	EP 0 278 131 A (BOC GROUP PLC) 17. August 1988 (1988-08-17) Spalte 3, Zeile 40 - Zeile 55; Abbildung 1	1
A	WO 99/45379 A (ABBOTT LAB) 10. September 1999 (1999-09-10) Zusammenfassung	1-51

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/008813

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2002191048 A1	19-12-2002	US 2003048341 A1	13-03-2003
		US 2002061258 A1	23-05-2002
		EP 1352112 A1	15-10-2003
		WO 02066713 A1	29-08-2002
		AU 2433602 A	02-04-2002
		AU 9311101 A	02-04-2002
		AU 9473301 A	02-04-2002
		CA 2423063 A1	28-03-2002
		CA 2423068 A1	28-03-2002
		EP 1324823 A2	09-07-2003
		EP 1337325 A2	27-08-2003
		JP 2004518520 T	24-06-2004
		JP 2004518411 T	24-06-2004
		WO 0224323 A2	28-03-2002
		WO 0224324 A2	28-03-2002
		WO 0224325 A2	28-03-2002
		US 2003052943 A1	20-03-2003
		US 2003138852 A1	24-07-2003
		US 2004119793 A1	24-06-2004
		US 2002085063 A1	04-07-2002
		US 2002061598 A1	23-05-2002
		US 2002037579 A1	28-03-2002
		US 2002037527 A1	28-03-2002
US 2003049642 A1	13-03-2003	CA 2434886 A1	25-07-2002
		EP 1360349 A1	12-11-2003
		WO 02057520 A1	25-07-2002
US 2002153055 A1	24-10-2002	US 2002139439 A1	03-10-2002
		WO 02076830 A1	03-10-2002
DE 19842797 C	27-01-2000	DE 19842797 C1	27-01-2000
		AT 219834 T	15-07-2002
		DE 59901839 D1	01-08-2002
		EP 0987543 A2	22-03-2000
		US 6355217 B1	12-03-2002
EP 0278131 A	17-08-1988	EP 0278131 A1	17-08-1988
		DE 3771482 D1	22-08-1991
		GB 2183500 A ,B	10-06-1987
WO 9945379 A	10-09-1999	AU 2887099 A	20-09-1999
		AU 767991 B2	27-11-2003
		AU 2987899 A	20-09-1999
		BG 104802 A	30-04-2001
		BR 9908563 A	21-11-2000
		CA 2321968 A1	10-09-1999
		CN 1299467 T	13-06-2001
		EP 1068531 A2	17-01-2001
		HU 0101959 A2	28-09-2001
		JP 2002506206 T	26-02-2002
		NO 20004433 A	06-11-2000
		PL 343264 A1	30-07-2001
		SK 13242000 A3	12-03-2001
		TR 200002572 T2	21-11-2000
		TR 200101127 T2	21-06-2002
		TR 200101129 T2	21-06-2002
		TR 200101200 T2	21-02-2002

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/008813

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9945379 A	-	WO 9945389 A2	10-09-1999
		WO 9945379 A2	10-09-1999
		US 6297021 B1	02-10-2001
<hr/>			